

JULIA SILKE ARETZ

Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion
des *Orphan Carriers* SLC10A5 *in vitro*
und im *Slc10a5*-Knockout-Mausmodell

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Geyer

**Untersuchungen zur
Lokalisation und Funktion
des *Orphan Carriers* SLC10A5 *in vitro* und im
Slc10a5-Knockout-Mausmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Julia Silke Aretz
Tierärztin aus Viersen

Gießen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. M. Kramer

1. Gutachter:	Prof. Dr. J. Geyer
2. Gutachter:	Prof. Dr. J. Roth

Tag der Disputation: 29. Juni 2015

– „meinen“ Mäusen –

„Die Wahrheit über die Natur
läßt sich nur in winzigen Splittern zutage fördern,
soviel steht inzwischen fest.“

(Hoimar von Ditforth, 1984)

Bereits publizierte Ergebnisse dieser Arbeit

Kongressbeiträge:

Aretz, J. S., Herebian, D., Geyer, J. (2014) SLC10A5 is involved in the intracellular conjugation of bile acids in the liver. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 387 Suppl 1 1-113

80. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Hannover; 01.04.2014-03.04.2014

Aretz, J. S., Geyer, J. (2013) SLC10A5: Ein neuer Gallensäuretransporter

23. Vetpharm-Symposium, Gießen; 12.09.2013-13.09.2013

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XI
Schreibweisen.....	XV
Vorsätze im Dezimalsystem.....	XV
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Transporterfamilie SLC-10	1
1.2 SLC10A5	1
1.3 Anatomie der Leber	3
1.4 Physiologie der Gallensäuren	4
1.5 Gallensäuresynthese.....	7
1.6 Enterohepatischer Kreislauf der Gallensäuren	8
1.7 Intrazellulärer Gallensäuretransport	10
1.8 Gallensäuresynthese und Gallensäurepool der Maus	11
1.9 Intestinale Bakterienflora bei Mensch und Maus	12
1.10 Beeinflussung des Gallensäurepools durch die intestinale Flora.....	13
1.11 Regulation von Gallensäure- und Lipidhomöostase.....	14
1.12 Zielsetzung.....	19
2 Material.....	20
2.1 Molekularbiologie.....	20
2.1.1 PCR-Primer	20
2.1.2 Real-Time-PCR-Assays	20
2.1.3 DNA-Polymerasen	20
2.1.4 Restriktionsenzyme	21
2.1.5 Vektoren	21
2.1.6 verwendete SLC10A5-/Slc10a5-Konstrukte	23
2.1.7 Elektrophorese	24
2.1.8 Kommerziell erhältliche Kits und Materialien	24
2.2 Zellkultur	24
2.3 Proteinisolation	26
2.4 Western Blot	26
2.5 Mikroskopische Verfahren	27
2.5.1 Immunhistologische Untersuchungen	27
2.5.2 Immunfluoreszenzuntersuchungen an Cryoschnitten.....	28
2.5.3 Immunfluoreszenzuntersuchungen an Zellen.....	29

2.6	Primärantikörper	30
2.7	Sekundärantikörper	31
2.8	<i>In-situ</i> -Hybridisierung	31
2.9	Radioaktive Transportmessungen	33
2.10	Fluoreszierende Gallensäuren	34
2.11	Versuchstiere	35
2.11.1	Mäuse	35
2.11.2	Ratten	35
2.11.3	Genotypisierung der <i>Slc10a5</i> -Knockout-Maus	35
2.11.4	Galleausscheidungsversuch <i>Slc10a5</i> -Knockout-Maus	36
2.12	Verbrauchsmaterialien	36
2.13	Chemikalien	37
2.14	Verwendete Geräte	38
2.15	Bioinformatische Programme	40
3	Methoden	41
3.1	Molekularbiologische Methoden	41
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
3.1.2	Real-Time-PCR	41
3.1.3	Agarose-Gelelektrophorese	43
3.1.4	Gel-Aufreinigung von DNA-Fragmenten	43
3.1.5	DNA-Klonierung	44
3.1.6	Mini-Präparation von Plasmiden	45
3.1.7	Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung	45
3.1.8	Sequenzierung	45
3.1.9	Isolation von totaler RNA	46
3.1.10	cDNA-Synthese	48
3.2	Genexpressionsanalyse mittels genomweiter Array-Analyse	48
3.3	Zellkultur	49
3.3.1	Einfrieren und Auftauen	50
3.3.2	Transfektion	50
3.4	Proteinmethoden	52
3.4.1	Extraktion von Membranproteinen	52
3.4.2	Gesamtproteinextraktion	52
3.4.3	Mitochondrienisolierung	53
3.4.4	Proteinkonzentrationsbestimmung	53
3.4.5	Western Blot	54
3.5	Mikroskopische Verfahren	55
3.5.1	Antikörperbasierte Proteindetektion	55
3.5.2	Immunhistologische Untersuchungen	55

3.5.3	Immunfluoreszenzuntersuchungen an Cryoschnitten.....	58
3.5.4	Immunfluoreszenzuntersuchungen an Zellen.....	58
3.5.5	Hämatoxillin-Eosin-gefärbte Schnitte	59
3.5.6	Fluoreszierende Gallensäuren	59
3.6	<i>In-situ</i> -Hybridisierung	60
3.7	Radioaktive Transportmessungen.....	63
3.7.1	Transportmessung an Digitonin-permeabilisierten HEK293-Zellen.....	63
3.7.2	Transportmessung an intakten HEK293-Zellen	63
3.7.3	Bestimmung von Radioaktivität und Proteingehalt.....	64
3.8	Versuchstiere	64
3.8.1	Die <i>Slc10a5</i> -Knockout-Maus	64
3.8.2	Rückkreuzung.....	65
3.8.3	Genotypisierung der <i>Slc10a5</i> -Knockout-Maus-Linie	67
3.8.4	Galleausscheidungsversuch <i>Slc10a5</i> -Knockout-Maus.....	68
3.8.5	Gallensäureanalytik	69
3.9	Statistische Auswertung.....	70
4	Ergebnisse	71
4.1	SLC10A5-Expression und Lokalisation	71
4.1.1	Expressionsprofil in verwendeten Zelllinien.....	71
4.1.2	<i>Slc10a5</i> -Gewebeexpression in der Maus.....	72
4.1.3	Lokalisation auf RNA-Ebene mittels <i>In-Situ</i> -Hybridisierung.....	72
4.1.4	Sortierungsvorhersage	75
4.1.5	Sortierungsstudien im Zellkulturmodell.....	76
4.2	Antikörperetablierung.....	81
4.2.1	hSLC10A5-Antikörper (Sigma)	81
4.2.2	hSLC10A5-Antikörper (Aviva).....	85
4.2.3	rSLC10A5-Antikörper (Eurogentec).....	86
4.3	Intrazelluläre Lokalisation von SLC10A5	91
4.4	Funktion.....	96
4.4.1	Transporterexpression bei Gallengangsligatur und Lipopolysaccharid-Behandlung	96
4.5	Transportmessungen im Zellkulturmodell.....	97
4.5.1	Transportmessung an intakten HEK 293-Zellen	97
4.5.2	Transportmessung an Digitonin-permeabilisierten HEK293-Zellen.....	99
4.5.3	Fluoreszierende Gallensäuren	101
4.6	Die <i>Slc10a5</i> -Knockout-Maus	102
4.7	Cholsäurefütterung der <i>Slc10a5</i> -Knockout-Maus	104
4.7.1	Gewicht.....	104
4.7.2	Klinische Veränderungen	106
4.7.3	Gallmenge.....	110

4.7.4	Zusammensetzung der Galle	110
4.7.5	Unterschiede der Genexpression der <i>Slc10a5</i> -Knockout- und Wildtyp-Maus ..	118
4.7.6	Genexpressionsunterschiede zwischen <i>Slc10a5</i> -Knockout- und Wildtyp-Maus mit Bezug zur Gallensäurehomöostase	121
4.7.7	Genexpression von Gallensäuretransportern in Dünndarm und Niere.....	124
4.7.8	Expression von <i>Slc10a5</i> in Leber und Niere	125
5	Diskussion	126
5.1	Lokalisation von SLC10A5	126
5.2	Suche nach der Funktion.....	128
5.3	Die <i>Slc10a5</i> -Knockout-Maus	129
5.4	Gallestoffwechsel bei der <i>Slc10a5</i> -Knockout-Maus	130
5.5	Pathologische Veränderungen nach Cholsäurefütterung	131
5.6	Gallensäurepool der <i>Slc10a5</i> -Knockout- und der Wildtyp-Mäuse.....	134
5.7	Unterschiede im Spektrum der sekundären Gallensäuren	136
5.7.1	Mögliche Gründe für das abweichende Spektrum sekundärer Gallensäuren bei der <i>Slc10a5</i> -Knockout-Maus	138
5.8	Unterschiede im Anteil unkonjugierter Gallensäuren	140
5.9	Mögliche Gründe für eine defiziente Konjugation bei der <i>Slc10a5</i> -Knockout-Maus...	142
5.9.1	CoenzymA-Mangel	143
5.9.2	Taurinmangel.....	144
5.9.3	Expression der CoA-Ligasen und Gallensäureaminotransferase	145
5.9.4	Hemmung der Konjugationsenzyme oder Abspaltung des CoenzymA von aktivierten Gallensäuren	147
5.9.5	Transport von Edukten und Produkten der Gallensäurekonjugationsreaktionen	149
5.10	Zunahme der Glycinkonjugation bei der <i>Slc10a5</i> -Knockout-Maus	154
5.11	Transport von Cholesterin und Phospholipiden.....	154
5.12	Einfluss der 0,5 % Cholsäurefütterung auf die Genexpression bei <i>Slc10a5</i> -Knockout- und Wildtyp-Mäusen	157
5.12.1	Gallensäuretransporter in Leber, Niere und Dünndarm	157
5.12.2	Gallensäuresynthese und Konjugation	161
5.13	Ausblick.....	163
6	Zusammenfassung.....	164
7	Summary	165
8	Literaturverzeichnis.....	167
9	Anhang	183
10	Danksagung	195

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Modelle der funktionellen Leberorganisation	4
Abb. 1.2 Chemische Struktur der Gallensäuren	5
Abb. 1.3 Schematische Übersicht über die Neusynthese der Gallensäuren	8
Abb. 1.4 Regulation der Gallensäurehomöostase bei Gallensäureüberschuss	18
Abb. 3.1 Qualitätsüberprüfung der RNA	48
Abb. 3.2 Schematische Darstellung der Rückkreuzung der <i>Slc10a5</i> -Knockout-Maus.....	66
Abb. 3.3 Schematische Darstellung des <i>Slc10a5</i> -Genlocus bei Knockout- und Wildtyp-Maus	67
Abb. 4.1 Expression von <i>SLC10A5</i> in HEK-SLC10A5-V5-, HepG2- und HEK293-Zellen...	71
Abb. 4.2 Expressionsprofil der <i>Slc10a5</i> -RNA in verschiedenen Mausgeweben	72
Abb. 4.3 Lage der <i>In-situ</i> -Hybridisierungssonden in der m <i>Slc10a5</i> -mRNA.....	73
Abb. 4.4 <i>In-situ</i> -Hybridisierung von <i>Slc10a5</i> in Mausgewebe mit Sonde 4.....	74
Abb. 4.5 Vergleich der intrazellulären Sortierung des Flag-, GFP- und V5-getaggten hSLC10A5 und des ungetaggtten rSLC10A5	77
Abb. 4.6 Untersuchung der Lokalisation des C-Terminus des SLC10A5-Proteins an transient hSLC10A5-V5 transfizierten HepG2-Zellen nach vollständiger und Digitoninpermeabilisierung	78
Abb. 4.7 Subzelluläre Lokalisation des SLC10A5-Proteins in transfizierten HepG2-Zellen..	80
Abb. 4.8 Lokalisation des SLC10A5-Proteins in transient m <i>Slc10a5</i> -V5 transfizierten HepG2-Zellen und stabil transfizierten HEK-SLC10A5-V5-Zellen	80
Abb. 4.9 Untersuchung zur Speziesreaktivität des SLC10A5-Ak (Sigma) an hSLC10A5- und m <i>Slc10a5</i> -transfizierten HepG2-Zellen.....	81
Abb. 4.10 Vergleich der SLC10A5-Aminosäuresequenz von Ratte, Maus und Mensch im Bereich des Immunisierungsepitops des hSLC10A5-Antikörpers (Sigma)	82
Abb. 4.11 Untersuchung der Spezifität des hSLC10A5-Ak (Sigma) am Zellmodell mittels Immunfluoreszenz	83
Abb. 4.12 Testung des hSLC10A5-Antikörpers (Sigma) auf seine Eignung für den Western Blot	84
Abb. 4.13 Immunfärbung von humanem Gewebe (Paraffinschnitte) mit dem hSLC10A5-Antikörper (Sigma).....	84
Abb. 4.14 Immunfluoreszenzuntersuchungen von stabilen HEK-SLC10A5-V5- und HepG2-Zellen mit dem hSLC10A5-Antikörper (Aviva).....	86
Abb. 4.15 Vergleich der SLC10A5-Proteinsequenz von Ratte, Maus und Mensch im Bereich des C-Terminus	87
Abb. 4.16 Speziesspezifität des rSLC10A5-Antikörpers	88
Abb. 4.17 Western-Blot-Analyse von Proteinpräparationen aus Rattengeweben mit dem rSLC10A5-Antikörper	89
Abb. 4.18 Immunhistologie von Rattengewebe mit dem rSLC10A5-Antikörper (Eurogentec)	90
Abb. 4.19 Doppelimmunmarkierung von Rattengewebe mit dem rSLC10A5- und dem Mitochondrien-Antikörper	93
Abb. 4.20 Western-Blot-Analyse von Mitochondrienaufräufungen aus Rattenleber- (A) und Mäusegewebe (B)	94

Abb. 4.21 Immunhistologie von Geweben der <i>Slc10a5</i> -Knockout- und Wildtyp-Mäuse mit dem rSLC10A5-Antikörper	95
Abb. 4.22 mRNA-Expression von <i>Slc10a5</i> , <i>Slc10a1</i> und <i>Abcb11</i> nach Gallengangsligatur und Lipopolysaccharidbehandlung bei der Ratte	96
Abb. 4.23 Gallensäureaufnahme in intakte HEK-SLC10A5-V5-, HEK-NTCP-Flag- und HEK293-Kontroll-Zellen	98
Abb. 4.24 Gallensäureaufnahme in Digitonin-permeabilisierten HEK-SLC10A5-V5-, HEK-NTCP-Flag- und HEK293-Kontroll-Zellen.....	100
Abb. 4.25 Intrazelluläres Verteilungsmuster von Fluoreszenz-markierten Gallensäuren.....	101
Abb. 4.26 Etablierung der <i>Slc10a5</i> -Genotypisierungs-PCR	102
Abb. 4.27 Nachweis des Genotyps der <i>Slc10a5</i> -Knockout-Mauslinie mittels PCR auf DNA- und RNA-Ebene	103
Abb. 4.28 Anfangsgewichte und Gewichtsentwicklung der <i>Slc10a5</i> -Knockout- und Wildtyp-Mäuse unter Cholsäurefütterung.....	105
Abb. 4.29 Vergleich der Darmveränderungen der <i>Slc10a5</i> -Knockout- und Wildtyp-Maus nach 0,5 % Cholsäurefütterung.....	106
Abb. 4.30 Prozentuale Organgewichte der <i>Slc10a5</i> -Knockout-Mäuse und Wildtyp-Mäuse nach Cholsäurefütterung	107
Abb. 4.31 H&E-Färbung von Dünndarmschnitten der <i>Slc10a5</i> -Knockout- im Vergleich zur Wildtyp-Maus nach Kontroll- oder Cholsäurefütterung	108
Abb. 4.32 H&E-Färbung von Leberschnitten der <i>Slc10a5</i> -Knockout- im Vergleich zur Wildtyp-Maus nach Kontroll- oder Cholsäurefütterung	109
Abb. 4.33 Gallenmenge der <i>Slc10a5</i> -Knockout- im Vergleich zur Wildtyp-Maus nach Kontroll- oder Cholsäurefütterung	110
Abb. 4.34 Gallensäurekonzentrationen in der Galle und dem peripheren Plasma von <i>Slc10a5</i> -Wildtyp- und -Knockout-Mäusen unter Kontrollfutter und 0,5 % Cholsäurefutter.....	112
Abb. 4.35 Gallensäurekonzentrationen in der Galle von <i>Slc10a5</i> -Wildtyp- und -Knockout-Mäusen bei Kontroll- und 0,5 % Cholsäurefütterung.....	114
Abb. 4.36 Cholesterol- und Phospholipidgehalte in Galle und Plasma	117
Abb. 4.37 Vergleich der Genexpression im Lebergewebe.....	123
Abb. 4.38 Transportergenexpression in Dünndarm (A) und Niere (B).....	124
Abb. 4.39 Expression der <i>Slc10a5</i> -mRNA in Leber (A) und Niere (B)	125
Abb. 5.1 Beispielhafte Tiere der F2-Generation: <i>Slc10a5</i> -Knockout- (A) und Wildtyp-Maus (B)	130
Abb. 5.2 Veränderungen im Gallensäurepool der <i>Slc10a5</i> -Knockout- und Wildtyp-Mäuse durch die 0,5 % Cholsäurefütterung.....	135
Abb. 5.3 Chemische Eigenschaften von Cholsäure, Taurocholsäure und Choloyl-CoA und ihr Einfluss auf die Membranpermeabilität.....	150
Abb. 5.4 Darstellung der pH-Werte der Zellkompartimente (A) und schematische Darstellung der Membrantopologie des SLC10A5-Proteins (B)	151
Abb. 5.5 Schematischer Ablauf der Gallensäureneusynthese, der Konjugation rezirkulierender Gallensäuren und des Gallensäuretransports	153

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1 Hydrophobizitätsindices der ionisierten Gallensäuren bei pH 8,5	6
Tab. 3.1 Hybridisierungs- und Waschprotokoll bei der In-situ-Hybridisierung	62
Tab. 4.1 Vorhersage der zellulären Sortierung des SLC10A5-Proteins mittels bioinformatischer Programme	75
Tab. 4.2 Verteilung der Genotypen bei het x het-Anpaarung	104
Tab. 4.3 Gallensäurekonzentrationen in der Galle von <i>Slc10a5</i> -Wildtyp- und -Knockout- Mäusen bei Kontroll- und 0,5 % Cholsäurefütterung	115
Tab. 4.4 Gallensäurekonzentrationen im peripheren Plasma von <i>Slc10a5</i> -Wildtyp- und - Knockout-Mäusen bei Kontroll- und 0,5 % Cholsäurefütterung	116
Tab. 4.5 Heat Map: Genexpression bei Kontrollfütterung <i>Slc10a5</i> -Knockout-/Wildtyp	119
Tab. 4.6 Heat Map: Genexpression bei Cholsäurefütterung <i>Slc10a5</i> -Knockout-/Wildtyp....	120
Tab. 9.1 Statistische Auswertung der Gallensäurekonzentrationen in der Galle	183
Tab. 9.2 Statistische Auswertung der Gallensäurekonzentrationen im Plasma	184
Tab. 9.3 Bezeichnungen der Proteine und der korrespondierenden Gene	185
Tab. 9.4 Hochregulierte Gene der <i>Slc10a5</i> -Knockout-Maus – Cholsäurefütterung/Kontrolle	186
Tab. 9.5 Herabregulierte Gene der <i>Slc10a5</i> -Knockout-Maus – Cholsäurefütterung/Kontrolle	188
Tab. 9.6 Hochregulierte Gene der <i>Slc10a5</i> -Wildtyp-Maus – Cholsäurefütterung/Kontrolle	191
Tab. 9.7 Herabregulierte Gene der <i>Slc10a5</i> -Wildtyp-Maus – Cholsäurefütterung/Kontrolle	193

Abkürzungsverzeichnis

129S5	Mausstamm 129SvEvBrd
3 α -HSD	3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
7-oxo-DC	7-oxo-Deoxycholsäure
Abb.	Abbildung
ACNAT	Acyl-CoenzymA-Aminosäure-N-Acyltransferase
ACOT	Acyl-CoA-Thioesterase
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazole
AF	Alexa Fluor
Ak	Antikörper
AKR	Aldo-Keto-Reduktase
APS	Ammonium Persulfate
ASBT	Apical Sodium-dependent Bile Acid Transporter
AUC	Area under the curve
ATP	Adenosintriphosphat
B6	Mausstamm C57BL/6
BAAT	Bile acid coenzyme A:amino acid N-acyltransferase
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serum Albumin

BSEP	Bile salt export pump
BSH	Bile Salt Hydrolase
CAR	Constitutive Androstane Receptor
CDC	Chenodeoxycholsäure
cDNA	complementary DNA
cm	Zentimeter
CoA	CoenzymA
COX	Cyclooxygenase
CSAD	Cystein Sulfinat Decarboxylase
CT	Signal Threshold Cycle
CV1	Nierenzelllinie aus der Afrikanischen Grünen Meerkatze
Cy3	Cyanin 3
CYP	Cytochrom P450
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Deoxycholsäure
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dpm	Disintegration per minute (Zerfall pro Minute)
E. coli	Escherischia coli
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F1	Filialgeneration 1
FABP	Fatty Acid Binding Protein
FATP	Fatty Acid Transporting Peptide
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	FGF Receptor Isotype 4
FKS	Fetales Kälberserum
FRT	Flp Recombination Target
FXR	Farnesoid X Rezeptor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein
GLUT	Glukosetransporter
g	Gramm oder Erdbeschleunigung, je nach Kontext
gPS	gProcessed Signal
h	Stunde
H&E	Hämatoxillin und Eosin
HDC	Hyodeoxycholsäure
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-ethansulfonsäure
HepG2	Human Hepatoma Cell Line
HGNC	<i>Human Genome Organisation Nomenclature Committee</i>
HI	Hydrophobizitätsindex
HNF	Hepatocyte Nuclear Factor

HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	Horseradish Peroxidase
HSDH	Hydroxysteroiddehydrogenasen
hSLC10A5	SLC10A5 des Menschen
HUGO	<i>Human Genome Organisation</i>
IC	Immunocytoologie
IHC	Immunhistochemie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IVC	Individually Ventilated Cage
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
ko	Knockout
l	Liter
LB	Lysogeny Broth
LC	Lithocholsäure
LHR	Liver Receptor Homologue
LogP	Logarithmus des n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten
LPS	Lipopolysaccharid
LXR	Liver X Receptor
m	Meter
MDR	Multidrug-Resistance-Protein
M	molar
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
MRP	Multidrug Resistance-related Proteine
mSLC10A5	SLC10A5 der Maus
MW	Mittelwert
NBD	4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
NBT-BCIP	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid/5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
n. d.	nicht detektierbar
NTB	CaCl ₂ -Tris-Puffer
NTCP	Na ⁺ /Taurocholate Cotransporting Peptide
OATP	Organic anion-transporting polypeptide
OST	Organic Solute Transporter
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroxonium-Ionen
PIPES	Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)
pKS	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
PPAR	Peroxisome Proliferative Receptor α
PXR	Pregnane X Receptor
RIN	RNA Integritätsnummer
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
rSLC10A5	SLC10A5 der Ratte
RXR	Retinoid X Receptor
S/W	Schwarz/Weiß
SD	Standard Deviation = Standardabweichung

SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SHP	Small Heterodimer Partner
SLC	Solute Carrier
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOAT	Sodium-dependent Organic Anion Transporter
SOC-Medium	Super Optimal Broth Medium + Glucose
SPF	Spezifiziert Pathogen-frei
SSC	Saline Sodium Citrate
SULT	Sulfotransferase
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TAUT	Taurin Transporter
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
THCA	3 α ,7 α ,12 α -Trihydroxy-5 β -Cholestansäure
TIGM	Texas A&M Institute for Genomic Medicine
T _m	Schmelztemperatur
TNMT-Puffer	Tris-Natrium-Magnesium-Triton-Puffer
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
I. E.	Internationale Einheit
U2OS	humane Osteosarkomzelllinie
UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-Glucuronosyltransferasen
UHPLC-MS/MS	Ultra High Performance Liquid Chromatographie-Tandem Mass Spectrometry
VDR	Vitamin D Receptor
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid

Abkürzungen der Gallensäuren

7-oxo-DC	
α -MC	α -Muricholsäure
β -MC	β -Muricholsäure
C	Cholsäure
CDC	Chenodeoxycholsäure
DC	Deoxycholsäure
GC	Glycocholsäure
GCDC	Glycochenodeoxycholsäure
GDC	Glycodeoxycholsäure
GHDC	Glycohyodeoxycholsäure
GLC	Glycolithocholsäure
GMC	Glycomuricholsäure
GUDC	Glycoursocholsäure
HDC	Hyodeoxycholsäure
LC	Lithocholsäure
LCS	Lithocholsäure-Sulfat
T-7oxo-DC	Tauro-7-oxo-Deoxycholsäure
TC	Taurocholsäure
TCDC	Taurochenodeoxycholsäure

TDC	Taurodeoxycholsäure
THDC	Taurohyodeoxycholsäure
TLC	Taurolithocholsäure
TMC	Tauromuricholsäure
TUDC	Tauroursodeoxycholsäure
UDC	Ursodeoxycholsäure
ω-MC	ω-Muricholsäure

Schreibweisen

In dieser Arbeit werden entsprechend den Nomenklaturregeln des *Human Genome Organisation Nomenclature Committee* (Wain et al. 2002) die Gene des Menschen in Großbuchstaben abgekürzt und kursiv geschrieben (*SLC10A5*) und die Proteine in Großbuchstaben nicht kursiv gesetzt (SLC10A5). Die Gene der Maus und der Ratte werden entsprechend der Nomenklaturregeln des *International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice* (www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml#ps) mit großem Anfangsbuchstaben und darauf folgenden Kleinbuchstaben (*Slc10a5*) abgekürzt und kursiv geschrieben, die Abkürzungen für Proteine in Großbuchstaben geschrieben und nicht kursiv gesetzt (SLC10A5). Für RNA-Transkripte werden dieselben Regeln wie für die Gene verwendet. Eine Auflistung der verwendeten Gen- und Proteinbezeichnungen findet sich im Anhang (Tab. 9.3).

Zur Kurzbezeichnung der Spezies wird ein Kürzel vor den Gen-/Proteinnamen gesetzt. Hierbei steht h für Mensch, m für Maus und r für Ratte, beispielsweise hSLC10A5.

Vorsätze im Dezimalsystem

Symbol	Potenz	Vorsilbe
f	10^{-15}	Femto
p	10^{-12}	Pico
n	10^{-9}	Nano
μ	10^{-6}	Mikro
m	10^{-3}	Milli
k	10^3	Kilo

1 Einleitung

1.1 Die Transporterfamilie SLC-10

Die Genfamilie der sogenannten *Solute Carrier* umfasst laut dem *Human Genome Organisation* (HUGO) *Nomenclature Committee* (HGNC) aktuell 52 Familien (SLC1 bis SLC52) mit insgesamt 456 einzelnen Genen beim Menschen (Gray et al. 2015; www.genenames.org). Die Familie SLC10, welche als „Familie der Na⁺-abhängigen Gallensäuretransporter“ bezeichnet wurde, umfasst sieben Mitglieder (SLC10A1 bis SLC10A7). Bei den zuerst entdeckten Carriern *Na⁺/Taurocholate Cotransporting Peptide* (NTCP/*SLC10A1*) (Hagenbuch et al. 1991; 1994) und *Apical Sodium-dependent Bile Acid Transporter* (ASBT/*SLC10A2*) (Wong et al. 1994; 1995) handelt es sich um Gallensäuretransporter, die gemeinsam den enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren (siehe Kapitel 1.6) aufrechterhalten. Dabei sorgt NTCP für die Aufnahme der Gallensäuren aus dem Pfortaderblut in die Leberzellen, und ASBT mit seiner hohen Expression im terminalen Ileum resorbiert die mit der Galle in den Dünndarm abgegebenen Gallensäuren zurück in die Enterozyten. Auch in den Tubuli der Niere kann ASBT glomerulär filtrierte Gallensäuren wieder aufnehmen (Alrefai et al. 2007; Dawson et al. 2009).

Zu den weiteren Mitgliedern der SLC10-Familie zählen SLC10A4, ein in synaptischen Vesikeln von Nervenzellen lokalisierter *Orphan Carrier* (Geyer et al. 2008), und der *Sodium-dependent Organic Anion Transporter* (SOAT/*SLC10A6*), ein Transporter für sulfatierte Steroide (Geyer et al. 2007). Zwei weitere *Orphan Carrier*, SLC10A3 und SLC10A5, haben eine Sequenzidentität von 33,9 % und eine Sequenzhomologie von 60,9 % auf Proteinebene und entstammen einem gemeinsamen Vorläufergen. Das *SLC10A3*-Gen zeigt eine ubiquitäre Expression und eine auf eine „Housekeeper“-Funktion hinweisende CpG-Insel in seiner Promotorregion. Bislang wurden jedoch weder die subzelluläre Lokalisation noch die Funktion von SLC10A3 aufgeklärt (Alcalay et al. 1988; Geyer et al. 2006). SLC10A7 repräsentiert das phylogenetisch am weitesten von den anderen Familienmitgliedern entfernte Protein (Godoy et al. 2007). Sein Homolog in *Candida albicans* scheint eine Steuerfunktion in der Calciumhomöostase von Hefezellen zu haben (Jiang et al. 2012; Alber et al. 2013).

1.2 SLC10A5

Das Transkript des *SLC10A5*-Gens wurde 2004 erstmals am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen beschrieben. Es wurde zunächst auf der Suche nach homologen Sequenzen zu den *SLC10A1*- und *SLC10A2*-Genen in den Gendatenbanken identifiziert und anschließend experimentell aus RNA von Mensch, Ratte und Maus

isoliert und kloniert. Aufgrund der Sequenzhomologie wurde *SLC10A5* als Mitglied Nummer 5 in die SLC10-Familie eingeordnet (Fernandes et al. 2007).

Das *SLC10A5*-Gen besteht im Gegensatz zu den anderen Genen der SLC10-Familie nur aus einem codierenden Exon. Basierend auf bioinformatischen Berechnungen wird von einer Membrantopologie mit neun (Fernandes et al. 2007) bzw. sieben Transmembrandomänen (Diss. Pellicoro 2008) und einem extrazellulären N-Terminus und intrazellulären C-Terminus ausgegangen.

Das humane SLC10A5-Protein besteht aus 438 Aminosäuren, das der Ratte und der Maus aus jeweils 434 Aminosäuren. Die höchste Sequenzidentität/-ähnlichkeit weist das humane SLC10A5-Protein gegenüber SLC10A3 mit 34 %/61 % auf. Die Proteine von Mensch, Ratte und Maus sind zu über 70 % identisch. Die Radioimmunopräzipitation des FLAG-getaggten SLC10A5-Proteins der Maus weist im Polyacrylamidgel eine Bande bei 42 kDa und eine schwächere bei 84 kDa auf, die auf eine Homodimerisierung hindeutet (Fernandes et al. 2007).

SLC10A5 zeigt beim Menschen eine hohe mRNA-Expression in der Leber und eine geringere in der Niere, während bei Ratte und Maus die Leber und die Niere gefolgt vom Darmtrakt die am stärksten exprimierenden Organe sind (Fernandes et al. 2007; Diss. Pellicoro 2008). Diese Expression stimmt beim Menschen, bei der Ratte und bei der Maus jeweils mit dem Expressionsprofil des Farnesoid-X-Rezeptors überein, einem für die Regulation der Gallensäurehomöostase wichtigen Kernrezeptor (Zollner et al. 2006a). In der Ratte wurde ein dreimal höheres *Slc10a5*-Expressionslevel in Hepatozyten als in der Nicht-Hepatozytenfraktion der Leber gefunden, was klar auf eine Lokalisation in den Hepatozyten hindeutet (Diss. Pellicoro 2008). Die *Slc10a5*-mRNA wurde bei der Ratte durch *In-situ*-Hybridisierung ebenfalls in Hepatozyten und in der Niere besonders in proximalen Tubuli nachgewiesen (Fernandes et al. 2007). *In vitro* lässt sich *SLC10A5* durch Chenodeoxycholsäure, einem FXR-Agonisten, stark herunterregulieren. Dies ließ sich *in vivo* an Gallengang-ligierten Ratten nachstellen, bei denen *Slc10a5* nach einer Woche genau wie *Slc10a1* herunterreguliert wird. SLC10A5-GFP ist in HepG2-Zellen in intrazellulären membranösen Strukturen und nicht in der Plasmamembran lokalisiert (Diss. Pellicoro 2008). Auch in U2OS-Zellen zeigte SLC10A5 eine intrazelluläre dem Golgi-Apparat ähnelnde Verteilung (Bijmans et al. 2012).

Transportstudien im *Xenopus laevis*-Oozytenmodell konnten für die SLC10A5-Proteine von Mensch und Maus keine Transportaktivität für die Gallensäuren Cholat und Taurocholat sowie die Steroidsulfate Estron-3-Sulfat und DHEAS zeigen (Fernandes et al. 2007).

1.3 Anatomie der Leber

Die Leber stellt eines der vielseitigsten Organe des Körpers dar. Einerseits bildet sie benötigte Stoffe für den Gesamtorganismus, zum Beispiel Plasmaproteine, andererseits ist sie für den Metabolismus und/oder die Ausscheidung von körpereigenen Stoffen und Fremdstoffen zuständig. Außerdem fungiert sie als exokrine Drüse, indem sie die Galle produziert.

Die Leber ist tierartspezifisch unterschiedlich stark segmentiert und teilt sich in mehrere Lappen auf. Den größten Anteil am Leberparenchym nehmen die Hepatozyten ein, die durch Cholangiozyten, Endothelzellen, Makrophagen (Kupfer-Zellen), Lymphozyten, Dendritische Zellen und Sternzellen komplettiert werden.

Die Leber wird afferent von der *Arteria hepatica* und der *Vena portae* versorgt, welche aus ihren letzten Verzweigungen die zwischen den von Hepatozyten gebildeten Leberzellbälkchen liegende Sinusoide mit arterio-venösem Mischblut versorgen. Der venöse Abfluss erfolgt über die Zentralvenen, die die kleinste Aufzweigung der *Vena hepatis* darstellt.

Die Leber kann modellhaft in Leberläppchen aufgeteilt werden, die nach histologischen oder funktionellen Gesichtspunkten gebildet werden (Abb. 1.1). Beim Schwein kann im Gegensatz zu den meisten anderen Säugern auch histologisch ein hexagonales Leberläppchen gesehen werden, da die terminalen Portalvenen von ausreichend Bindegewebe begleitet werden. Modellhaft ist ein hexagonales Leberläppchen aus der Zentralvene und den diese umgebenen Leberzellbälkchen aufgebaut (von der efferenten Seite her gesehen). An den Ecken dieser Läppchen befinden sich die Glisson-Dreiecke, in denen die Lebertrias aus Vene, Arterie und Gallengang liegen. Das periportale Läppchen setzt den Gallengang in der Lebertrias in den Mittelpunkt und soll sein Galleinzugsgebiet abbilden.

Das Azinusmodell nach Rappaport geht von der afferenten Seite her aus und fasst in einen Azinus den von einer terminalen Aufspaltung der *Vena portae* versorgten Teil zusammen. Der Leberazinus kann von der afferenten zur efferenten Seite gesehen in drei Zonen (I, II, III) aufgeteilt werden, in denen unterschiedliche Stoffwechselprozesse ablaufen. Die Konzentration an Sauerstoff fällt von Zone I zu III, genau wie die Konzentration an im Blut vorhandenen Stoffen, während wieder andere Metaboliten von den Leberzellen in Zone I abgegeben werden, die auf Zone III wirken (Kühnel 2008; Grisham 2009; Liebich 2010).

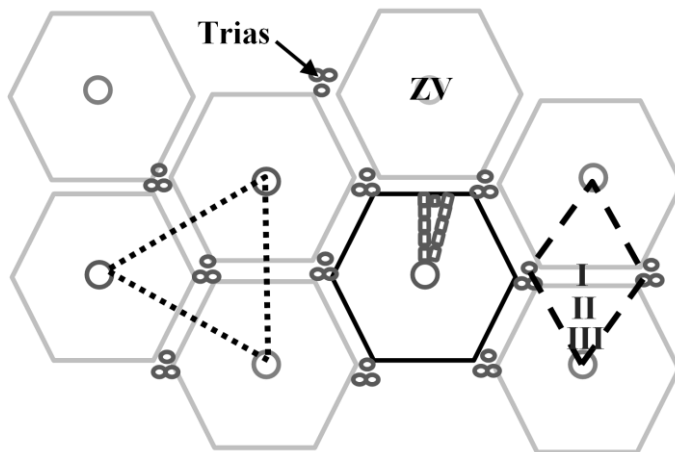


Abb. 1.1 Modelle der funktionellen Leberorganisation

Dargestellt sind die drei verbreiteten Modelle zur strukturellen und funktionellen Gliederung der Leber: Das hexagonale Leberläppchen (durchgehende Linie), das periportale Leberläppchen (gepunktete Linie) und der Leberazinus (gestrichelte Linie) mit den Zonen I, II und III

Trias = Lebertrias mit Gallengang, Arterie und Vene; ZV = Zentralvene

1.4 Physiologie der Gallensäuren

Gallensäuren sind amphiphile Moleküle mit einem Steroidgrundgerüst, die sich vom Cholesterin herleiten. Die Hauptgallensäuren der Säugetiere sind die C24-Gallensäuren (Abb. 1.2 A, B), während auch C27-Gallensäuren und -alkohole vorkommen. Das Spektrum der Gallensäuren ist stark speziessabhängig. Es setzt sich aus den primären Gallensäuren zusammen, die in der Leber gebildet und durch bakterielle Fermentation im Darm zu sekundären Gallensäuren verändert werden. Werden diese rückresorbiert, können sie in den Leberzellen zu tertiären Gallensäuren modifiziert werden. In den meisten Säugetierspezies werden Gallensäuren nahezu vollständig konjugiert in die Galle abgegeben. Klassischerweise wird von konjugierten Gallensäuren gesprochen, wenn die Konjugation von Taurin oder Glycin an C24 der Gallensäuren über eine N-Acyl-Amidation stattgefunden hat. Gallensäuren können aber beispielsweise auch an C24 glucuronidiert oder, vornehmlich an C3, sulfatiert werden. Ob eine Gallensäure mit Taurin oder Glycin konjugiert wird, ist stark speziesspezifisch und hängt von der lokalen Konzentration von Glycin und Taurin sowie der Substratspezifität der Gallensäure-Aminotransferase ab. Beim Menschen tritt die Konjugation mit beiden auf, wobei vermehrt mit Glycin konjugiert wird, während bei Nagern fast ausschließlich Taurin-konjugierte Gallensäuren vorherrschen (Moschetta et al. 2005; Hofmann et al. 2008; Monte et al. 2009; Hofmann 2009b; Hofmann et al. 2010).

Unkonjugierte Gallensäuren weisen einen pK_s -Wert von etwa 5 auf, der durch die Konjugation mit Glycin auf 4 und auf unter 2 durch Taurinkonjugation sinkt (Linnet 1983; Fini et al. 1987; Hofmann et al. 2008; Hofmann 2009b). Somit liegen die konjugierten Gallensäuren bei

physiologischem pH-Wert quasi vollständig ionisiert vor. Aus diesem Grund werden die in der Galle und dem Dünndarminhalt gelösten, ionisierten Gallensäuren auch als Gallensalze bezeichnet.

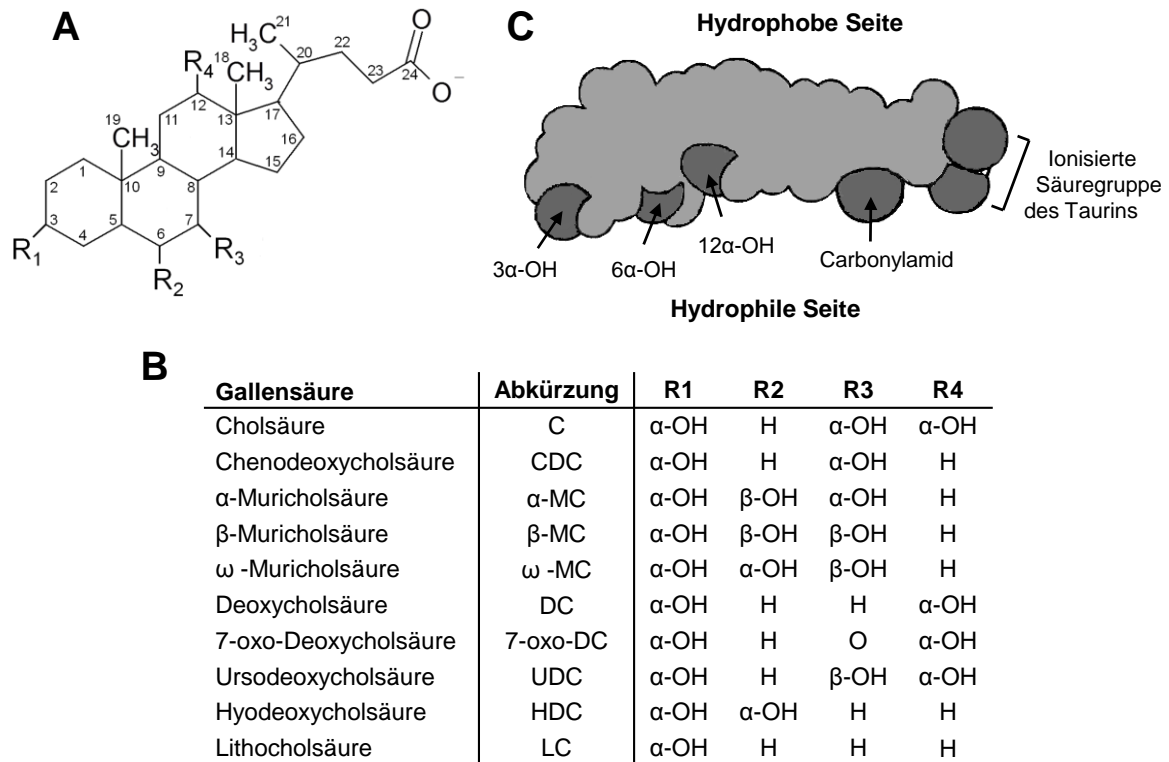


Abb. 1.2 Chemische Struktur der Gallensäuren

(A) Allgemeines Schema einer C-24-Gallensäure

(B) Hauptgallensäuren von Mensch und Maus

(C) Kalottenmodell von Taurocholsäure in Seitenansicht (modifiziert nach Hofmann und Hagey 2008)

Durch ihren amphiphilen Charakter mit einer hydrophilen und -phoben Seite bilden Gallensäuren in einem bestimmten Konzentrationsbereich (Kritische Mizelläre Konzentration) Mizellen (Abb. 1.2 C). Physiologischerweise liegen sie in der Galle als gemischte Mizellen mit Phospholipiden vor. In diese Mizellen können Cholesterin, Lipide, Fettsäuren, Monoglyzeride und fettlösliche Vitamine integriert werden, wodurch sie den Bürstensaumzellen des Dünndarms zugänglich sind und ihre Aufnahme in den Körper ermöglicht wird (Hofmann 1984; Hofmann et al. 1984; Hofmann et al. 2008; Monte et al. 2009).

Die Gallensäuren können in hydrophile und hydrophobe Gallensäuren eingeteilt werden. Hierfür wird der Hydrophobizitätsindex (HI) verwendet. Dieser leitet sich aus der experimentell ermittelten Retentionszeit bei der HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*/Hochdruckflüssigkeitschromatographie) ab. Der HI von Taurocholat wird dabei als 0 und der von Tauroolithocholat als 1 gesetzt, und die Hydrophobizitätsindices der anderen Gallensäuren

werden im Verhältnis dazu berechnet. Gallensäuren mit einem negativen Hydrophobizitätsindex werden als hydrophil und mit einem positiven als hydrophob eingestuft (Tab. 1.1). Durch die Konjugation mit Glycin und stärker noch mit Taurin erhöht sich die Hydrophilie der Gallensäuren. Hydrophobe Gallensäuren wie Deoxycholsäure weisen jedoch auch in ihrer konjugierten Form einen positiven HI auf (Heuman et al. 1989; Heuman 1989; Posa 2014).

Tab. 1.1 Hydrophobizitätsindices der ionisierten Gallensäuren bei pH 8,5

* (Posa 2014) # (Heuman et al. 1989)

Gallensäure	unkonjugiert	Taurin-konjugiert [#]	Glycin-konjugiert [#]
Ursocholsäure	−0,82*	−0,94	−0,89
α-Muricholsäure	n.d.	−0,84	−0,79
β-Muricholsäure	n.d.	−0,78	−0,73
Ursodeoxycholsäure	−0,33*/−0,31 [#]	−0,47	−0,43
Hyocholsäure	−0,29*	−0,39	−0,4
Hyodeoxycholsäure	−0,25*	−0,31	−0,26
Cholsäure	+0,13* [#]	+0,0	+0,07
Chenodeoxycholsäure	+0,58*/+0,59 [#]	+0,46	+0,51
Deoxycholsäure	+0,73*/0,72 [#]	+0,59	+0,65
Litocholsäure	n.d.	+1,0	+1,05

Generell werden hydrophobe Gallensäuren als zytotoxischer, lithogener und hepatotoxischer eingestuft als hydrophile Gallensäuren, weiterhin können sie Cholestase induzieren. Hingegen werden vor allem der hydrophilen Ursodeoxycholsäure zytoprotektive Eigenschaften zugesprochen (Attili et al. 1986; Galle et al. 1990; Carulli et al. 2000; Higuchi et al. 2004).

Die chronische Gabe von Ursodeoxycholsäure und β-Muricholsäure kann außerdem zur Auflösung von Cholesterolgallensteinen eingesetzt werden (Tint et al. 1982; Wang et al. 2002). Ursodeoxycholsäure ist als Wirkstoff in zahlreichen Medikamenten zur Auflösung von Cholesterolgallensteinen und bei biliärer Zirrhose zugelassen (www.gelbe-liste.de).

1.5 Gallensäuresynthese

Gallensäuren werden in der Leber über mehrere Zwischenreaktionen aus Cholesterin synthetisiert (Abb. 1.3). Der klassische (neutrale) Syntheseweg findet vollständig nur in Hepatozyten statt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die 7 α -Hydroxylierung des Cholesterins durch die Cholesterol-7 α -Hydroxylase (CYP7A1) im Endoplasmatischen Retikulum. Beim alternativen (sauren) Syntheseweg erfolgt zunächst die Hydroxylierung der Seitenkette durch die Sterol-27-Hydroxylase (CYP27A1) im Mitochondrium und danach die 7 α -Hydroxylierung im Endoplasmatischen Retikulum, in diesem Fall jedoch von CYP7B1. Die folgenden Modifikationen laufen für die Intermediate beider Synthesewege gleich ab. Das Steroidgerüst wird über die 3 β -Hydroxy-C27-Steroid-Oxidoreduktase (HSD3B7) modifiziert. Wird das entstehende 7 α -Hydroxy-Cholesten-3-on durch die Sterol-12 α -Hydroxylase (CYP8B1) an C12 hydroxyliert, wird die Trihydroxy-Gallensäure Cholsäure gebildet, unterbleibt dieser Schritt, entsteht die dihydroxylierte Chenodeoxycholsäure. Die Aktivität des CYP8B1 entscheidet also über das Verhältnis zwischen diesen beiden Gallensäuren. An den Zwischenprodukten erfolgen im Zytoplasma weitere Modifikationen am Steroidgrundgerüst über die Δ^4 -3-Ketosteroid-5- β -Reduktase (AKR1D1) und die 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (AKR1C4). Intermediate aus dem klassischen Syntheseweg werden nun noch im Mitochondrium der Hydroxylierung der Seitenkette über CYP27A1 unterzogen (Russell 2003; Chiang 2004; Pellicoro et al. 2007; Hofmann et al. 2008; Thomas et al. 2008; Monte et al. 2009).

Für die Umwandlung des C27- in ein C24-Gerüst mittels β -Oxidation im Peroxisom muss zunächst die Kopplung der Di- oder Trihydroxy-Cholestansäure mit CoenzymA durch die Gallensäure-CoenzymA-Ligase (SLC27A2) erfolgen (Russell et al. 1992; Pellicoro et al. 2007; Hofmann et al. 2008; Thomas et al. 2008).

Manche Arbeitsgruppen favorisieren auch eine Aktivierung mit CoA durch FATP2 (SLC27A2) oder FATP5 (SLC27A5) im Endoplasmatischen Retikulum und folgend einen ATP-abhängigen Transport in das Peroxisom (Une et al. 2003; Ferdinandusse et al. 2009). Im letzten Schritt wird Taurin oder Glycin unter CoA-Abspaltung durch die Gallensäure-CoenzymA:Aminosäure N-Acyltransferase (BAAT = *Bile acid coenzyme A:amino acid N-acyltransferase/BAAT*) konjugiert. Die beiden primären Hauptgallensäuren Cholsäure und Chenodeoxycholsäure liegen somit konjugiert als Tauro-/Glycocholol (TC/GC) oder Tauro-/Glycochenodeoxycholol (TCDC/GCDC) vor. Nachdem sie über bisher unbekannte Transportmechanismen die Peroxisomen verlassen haben, können sie über BSEP (Bile Salt Export

Pump/*ABCB11*) in die Gallekanälchen abgegeben werden (Russell et al. 1992; Russell 2003; Pellicoro et al. 2007; Hofmann et al. 2008; Thomas et al. 2008).

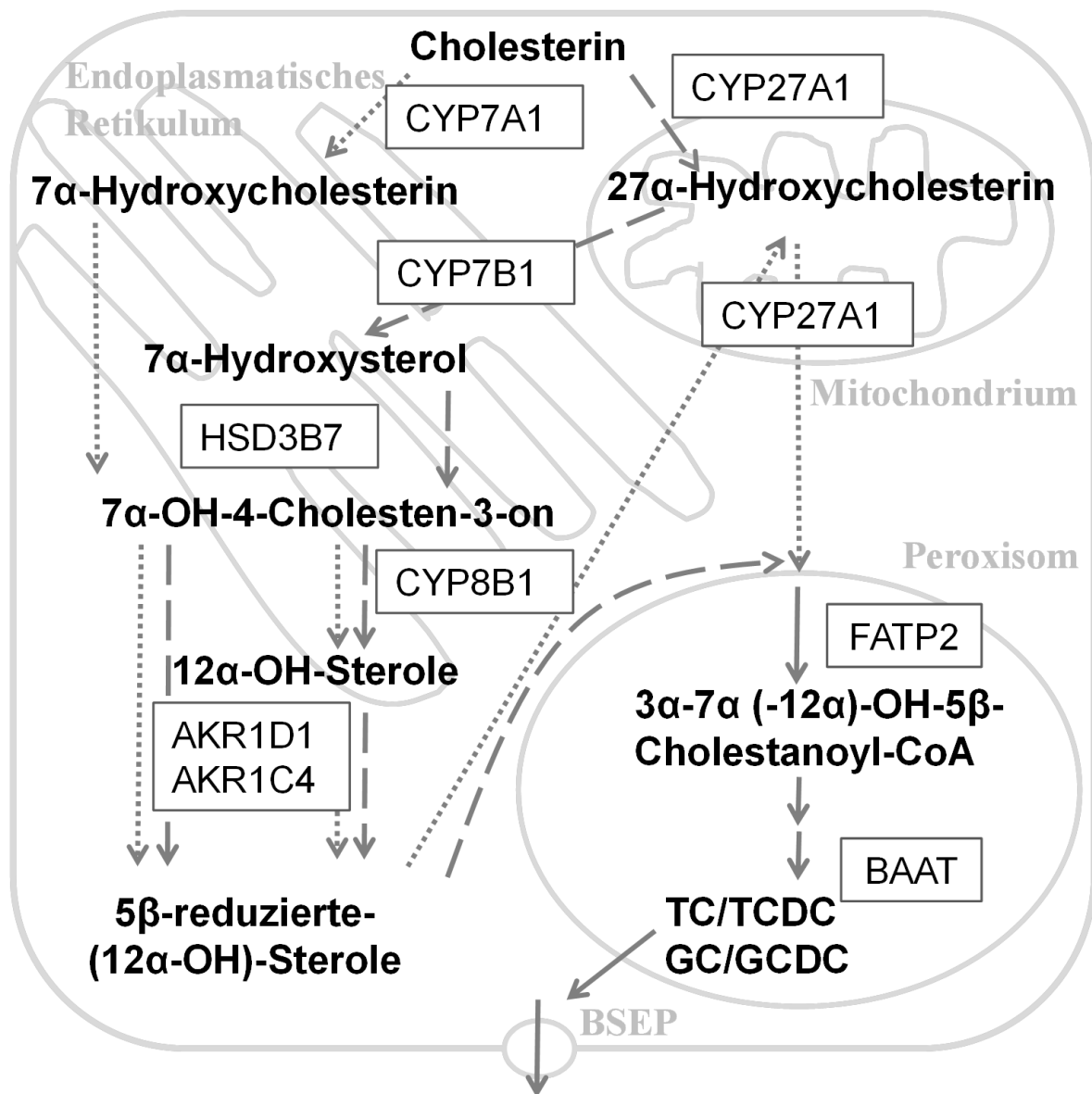


Abb. 1.3 Schematische Übersicht über die Neusynthese der Gallensäuren

Die Neusynthese von Gallensäuren geht vom Cholesterin aus und läuft über den klassischen (gepunktete Pfeile) und den alternativen Syntheseweg (gestrichelte Pfeile) mit gemeinsamen Endschritten zur Taurin/Glycin-Konjugation (durchgehende Pfeile) ab.

1.6 Enterohepatischer Kreislauf der Gallensäuren

Gallensäuren unterliegen einem ausgeprägten enterohepatischen Kreislauf, bei dem beim Menschen mehr als 95 % der in den Darm abgegebenen Gallensäuren wieder rückresorbiert werden. Der Gallensäurepool des Menschen wird so bei 2 bis 4 g und der Maus bei 4 mg gehalten. Während einer Mahlzeit können die Gallensäuren mehrere Male rezirkulieren, sodass beim Menschen bis zu 30 g/Tag und der Maus 20 mg/Tag rückresorbiert werden (Dawson et

al. 2009). Der Großteil der Gallensäuren wird aus den Leberzellen gegen einen hohen Konzentrationsgradienten über BSEP (Gruppe der *ATP-binding Cassette Transporter*, *ABCB11*) primär aktiv in die Galle transportiert. Eine untergeordnete Stellung nehmen MRP2 (*Multi-drug Resistance-associated Protein 2*, *ABCC2*) und MDR1 (*Multi Drug Resistance Protein 1*, *ABCB1*) ein, die aber auch seltenere oder sulfatierte Gallensäurespezies in die Gallekanälchen transportieren können. Ein Transport auf die Blutseite ist über MRP3 (*ABCC3*) oder MRP4 (*ABCC4*) und OST α/β (*Organic solute transporter/SLC51A/SLC51B*) möglich und erfolgt meist als kompensatorischer Mechanismus unter cholestatischen Bedingungen (Hofmann et al. 2008; Dawson et al. 2009; Klaassen et al. 2010).

Die Gallensäuren gelangen über die Galle in den Dünndarm, von wo sie größtenteils wieder rückresorbiert werden. Dies geschieht vor allem durch den ASBT, welcher in der apikalen Membran der Enterozyten des terminalen Ileums besonders die konjugierten Gallensäuren in die Zellen aufnimmt. Auf der basolateralen Seite werden die Gallensäuren über das Transporterdimer OST α /OST β in das Blut abgegeben. Bei der Maus, welche fast 100 % Taurin-konjugierte Gallensäuren besitzt, welche im Dünndarm vollständig ionisiert vorliegen und passive Absorption verhindern, konnte mit der *Slc10a2*-Knockout-Maus die prädominante Rolle des ASBT in der Rückresorption von konjugierten Gallensäuren bestätigt werden (Dawson et al. 2003; Dawson et al. 2009). Beim Menschen und anderen Spezies, die zusätzlich einen größeren Anteil an Glycin-konjugierten oder auch unkonjugierten Gallensäuren in den Darm abgeben, liegen diese vermehrt protoniert, also ungeladen, vor und können passiv resorbiert werden. Auch weitere Transportsysteme, zum Beispiel Mitglieder der OATP-Familie (*Organic Anion Transporting Polypeptide*), sind vermutlich am intestinalen Gallensäuretransport beteiligt (Dawson et al. 2009).

Die Gallensäuren gelangen über das Pfortaderblut größtenteils an Plasmaproteine gebunden wieder zurück in die Leber, wo sie besonders in die periportalen Hepatozyten aufgenommen werden (Hofmann et al. 2008; Hofmann 2009b). Hierfür dienen aktive Transporter. NTCP transportiert Natrium-abhängig vor allem konjugierte, geringer effektiv aber auch unkonjugierte Gallensäuren in die Hepatozyten. Eine verminderte oder fehlende Transportfähigkeit von NTCP – wie an einer Patientin mit funktionsbeeinträchtigendem Polymorphismus im *SLC10A1*-Gen und der *Slc10a1*-Knockout-Maus gezeigt wurde – geht mit einem erhöhten Plasmagallensäurenspiegel, aber keiner Unterbrechung der enterohepatischen Zirkulation einher (Vaz et al. 2015; Slijepcevic et al. 2015). Denn auch Natrium-unabhängiger Transport von konjugierten und unkonjugierten Gallensäuren über Organic Anion Transporter – wie OATP1B1 beim Menschen und OATP1A1, 1A4, 1B2 und 1B4 bei der Maus – tritt auf

(Dawson et al. 2009; Klaassen et al. 2010; Hagenbuch et al. 2013). Für unkonjugierte Gallensäuren wird weiterhin die Aufnahme über FATP5 mit gleichzeitiger CoenzymA-Kopplung favorisiert. Für Mono- und Dihydroxy-Gallensäuren stellt die passive Aufnahme durch Flip-flop durch die Membran eine weitere Möglichkeit des Eintritts in die Zelle dar (Hofmann 2009b).

1.7 Intrazellulärer Gallensäuretransport

Der intrazelluläre Transport von Gallensäuren sowohl in den Leber- als auch den Dünndarmzellen wurde bisher mit unterschiedlichen Methoden untersucht, konnte jedoch noch nicht ausreichend aufgeklärt werden. Nach ausführlichen Studien in den 1990er Jahren wurden wenige neuere Untersuchungen publiziert (Meier 1995; Crawford 1996; Agellon et al. 2000; Zwicker et al. 2013).

Als eine Möglichkeit wurde ein intrazellulärer Mikrotubuli-abhängiger Vesikel-vermittelter Transportweg von Gallensäuren vorgeschlagen, der auf mikroskopischen Studien mit fluoreszierenden Gallensäuren (Kitamura et al. 1990; Wilton et al. 1994) und *In-vivo*-Transportstudien in der Ratte beruht (Crawford et al. 1993; Crawford et al. 1994b). Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die Hemmung von Mikrotubuli mit Colchicin negativ auf den Gallensäuretransport auswirkte.

Vor allem hydrophobe Gallensäuren wie Lithocholat könnten diesen intrazellulären Weg einschlagen (Wilton et al. 1994). Bei supra-physiologischen Konzentrationen wurde für mehrere Gallensäuren ein vesikulärer Transport beobachtet. Ergebnisse, die unter Nutzung fluoreszierender Gallensäuren zustande gekommen sind, müssen jedoch sorgsam abgewägt werden, weil sich Fluorophor-gekoppelte Gallensäuren unter Umständen anders in der Zelle verhalten als nicht-modifizierte Gallensäuren (Holzinger et al. 1997).

Vor allem für konjugierte Trihydroxygallensäuren – gezeigt für Taurocholat – ist eine zytosmatische Verteilung via Diffusion wahrscheinlich (Aoyama et al. 1991; Alvaro et al. 1995; Meier 1995). Sie findet wahrscheinlich Protein-gebunden statt. Als Kandidaten gelten Enzyme, die auch an der Gallensäuresynthese beteiligt sind wie die 3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen. Für diese wurde neben der Fähigkeit, Gallensäuren zu binden, auch ein verminderter intrazellulärer Transport von Glycocholat bei 3 α -HSD-Hemmung durch Indomethacin gesehen (Takikawa et al. 1996; Jin et al. 2001). Auch für Glutathion-S-Transferasen wurden Gallensäurebindungseigenschaften nachgewiesen, jedoch ist eine physiologische Bedeutung umstritten (Yamamuro et al. 1994; Dietrich et al. 1995). Aus der Familie der Fettsäurebindenden Proteine zeigen FABP1 (*Fatty Acid Binding Protein 1*) in der Leber und dem

Dünndarm und ILBP (*Ileal Lipid Binding Protein*, FABP6), das vor allem im Ileum, aber auch in Cholangiozyten und im Ovar exprimiert wird, Bindeaktivität für Gallensäuren. Für beide Proteine zeigten Experimente mit der entsprechenden Knockout-Maus eine Störung der Gallensäurehomöostase, die die Beteiligung der Proteine am intrazellulären Transport und Metabolismus unterstreichen (Martin et al. 2005; Praslickova et al. 2012).

Neben dem Transport von der sinusoidalen zur kanalikulären Seite der Leberzelle konnte eine Akkumulation von radioaktiv oder fluoreszierend markierten Gallensäureanaloga im glatten endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat beobachtet werden (Suchy et al. 1983; Crawford et al. 1994a; Crawford 1996). Bei kinetischen Studien mit Taurocholat in der Ratte fiel auf, dass sich die Leber in ein schnelleres und langsames Kompartiment aufteilen ließ, was zu der Hypothese führte, dass bei hohen Konzentrationen die Gallensäure in Organellen gespeichert oder daran gebunden und dadurch langsamer eliminiert wird (Deroubaix et al. 1991). Das Einbeziehen von Organellen könnte also entweder Teil eines auf Vesikeln basierenden Transportsystems sein oder eine Sackgasse, aus der sie wieder abgegeben werden (Crawford 1996; Agellon et al. 2000).

1.8 Gallensäuresynthese und Gallensäurepool der Maus

Wie bereits erwähnt, ist das Vorkommen verschiedener Gallensäuren im Gesamtpool stark speziesabhängig. Der Mensch besitzt als Hauptgallensäuren Cholsäure und Chenodeoxycholsäure, welche zu einem hohen Anteil Glycin- aber auch Taurin-konjugiert vorkommen (Hofmann et al. 2008; Monte et al. 2009). Bei der Maus wird die Chenodeoxycholsäure hydroxyliert zu α -Muricholsäure, welche durch 7-OH-Epimerisierung in β -Muricholsäure umgewandelt werden kann. Die Konjugation erfolgt zu fast 100 % mit Taurin. Im Darm wird Cholsäure zu Deoxycholsäure, Chenodeoxycholsäure zu Lithocholsäure bzw. Ursodeoxycholsäure, α -Muricholsäure zu Murideoxycholsäure und β -Muricholsäure zu ω -Muricholsäure bzw. Hyodeoxycholsäure durch die bakterielle Flora umgewandelt (Agellon 2002; Martin et al. 2007; Fu et al. 2012).

Alnouti et al. (2008) fassten retrospektiv Daten zusammen, bei denen in neun Publikationen eine Gesamtgallensäurekonzentration von 0,04 bis 1,2 mol/g bzw. 20 bis 618 g/g im Lebergewebe und in elf Studien Konzentrationen von 32 bis 200 $\mu\text{mol/ml}$ bzw. 16 bis 102 mg/ml in der Mausgalle gemessen wurden. Bei den von ihm untersuchten C57BL/6-Männchen zeigte sich eine Gallensäurezusammensetzung von 99,6 % Taurinkonjugaten, 0,1 % Glycinkonjugaten und 0,4 % unkonjugierter Gallensäuren, bei welchen mit 46 % Taurocholsäure und mit 49 % Murocholsäure dominierten. Entsprechend sind Taurocholsäure und Tauromurochol-

säuren die Hauptgallensäuren der Maus, und somit ist der Gallensäurepool der Maus wesentlich hydrophiler als der des Menschen (siehe Kapitel 1.4) (Pawlikowska et al. 2004; Alnouti et al. 2008; Zhang et al. 2011; Fu et al. 2012).

Die bei der Maus fast vollständig als Taurinkonjugate vorliegenden Gallensäuren weisen einen pKs-Wert von 2 auf. Gleichzeitig ist auch der pH-Wert im Darm der Maus wesentlich niedriger als beispielsweise beim Menschen und liegt vom Dün- bis zum Dickdarm konstant zwischen pH 4 und pH 5. Dadurch liegen konjugierte Gallensäuren vorwiegend ionisiert vor, während unkonjugierte Gallensäuren – etwa Cholat – durch ihren pKs Wert von 5 bei einem pH unter 5 eine Verschiebung des Gleichgewichts zur protonierten und damit ungeladenen Form zeigen, wodurch die unkonjugierte Gallensäure passiv resorbiert werden kann (Cabral et al. 1986; Fallingborg 1999; McConnell et al. 2008).

1.9 Intestinale Bakterienflora bei Mensch und Maus

Der Magen-Darm-Trakt von Säugetieren wird von unzähligen Mikroorganismen bevölkert, deren Anzahl ungefähr zehnfach die Gesamtheit aller Zellen des Körpers übersteigt. Mit vielen dieser Mikroorganismen besteht eine symbiotische Beziehung, da diese an der Verdauung ansonsten unverdaulicher Pflanzenpolysaccharide mitwirken und essenzielle Aminosäuren und Vitamine bereitstellen. Insbesondere Pflanzenfresser sind auf die Verdauung in ihren Bio-reaktoren Vormagen oder Cäcum angewiesen (Bäckhed et al. 2005). Die Besiedlung des Darms mit Bakterien nimmt mengenmäßig vom Dün- zum Dickdarm stark zu. So bevölkern das menschliche Duodenum 10^3 Bakterien/ml, das Ileum 10^6 bis 10^8 und den Dickdarm 10^{11} (Wilson 2005; Ridlon et al. 2006). Die Diversität der Bakterien ist aber verglichen mit beispielsweise der Bodenflora überschaubar und bildet sich quantitativ vor allem aus den *Genera Bacteroides*, *Chlostridia* und *Eubacterium* (Bäckhed et al. 2005). Zur humanen Dickdarmflora tragen insbesondere *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Streptococcus* und *Methanobrevibacter* bei. Den Dünndarm besiedeln *Lactobacillus*, *Enterobacteria*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Chlostridium* und *Veillonella* (Wilson 2005; Ridlon et al. 2006).

Auch die intestinale Flora der Maus setzt sich aus ähnlichen Gruppen zusammen. In allen Teilen des Magen-Darm-Trakts können Bakterien der Stämme *Bacterioidetes*, *Firmicutes* und *Proteobacteria* gefunden werden. Erste Untersuchungen wurden mit Anzuchtverfahren durchgeführt. Dabei konnten Lactobazillen und anaerobe Streptokokken im gesamten Magen-Darm-Trakt sowie *Bacteroides* und *Chlostridia* und in geringerer Anzahl *Enterobacteria* und *Enterococcus* nachgewiesen werden (Schaedler et al. 1965; Dubos et al. 1965). Durch Analy-

se von 16S-RNA konnte zusätzlich eine Vielzahl schlecht anzüchtbarer Bakterienspezies nachgewiesen werden. In grober Übersicht auf Ebene der Bakterienklassen waren die *Bacilli* vor allem im Dünndarm, die *Bacteroides* über den gesamten Darmtrakt und die *Clostridia* vermehrt im Dickdarm angesiedelt. Vor allem im Magen und im Dünndarm ließen sich auf Familienebene *Lactobacillaceae* nachweisen, während hauptsächlich im Dickdarm *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*, *Lachnospiraceae* und *Ruminococcaceae* vorkamen. Trotz der Verwendung von zusammen gehaltenen SPF-C57BL/6-Mäusen gab es in dieser Studie starke interindividuelle Schwankungen in der Zusammensetzung der Flora (Gu et al. 2013).

1.10 Beeinflussung des Gallensäurepools durch die intestinale Flora

Die bakterielle Besiedlung des Darms spielt eine entscheidende Rolle in der Zusammensetzung des Gallensäurepools. In Kapitel 1.4 wurde bereits erwähnt, dass sich der Gallensäurepool aus den primären Gallensäuren, die in der Leber synthetisiert werden, den sekundären Gallensäuren, die durch Modifikationen intestinaler Bakterien entstehen, und den tertiären Gallensäuren, die durch weitere Umwandlungen in der Leber aus sekundären Gallensäuren entstehen, zusammensetzt. Die in die Galle abgegebenen konjugierten Gallensäuren werden zum größten Teil unverändert im Ileum vom ASBT reabsorbiert. Ein kleiner Teil unterliegt aber der bakteriellen Transformation. Dieser Prozess beginnt schon im Dünndarm mit der Dekonjugation der Gallensäuren. Bakterielle Gallensäure-Hydrolasen (BSH = *Bile Salt Hydrolase*) beispielsweise aus *Lactobacillus* oder *Bifidobacterium ssp.* katalysieren dies. Hydroxylgruppen können bereits im Dünndarm, auch bei konjugierten Gallensäuren, oxidiert werden. Mit Zunahme der bakteriellen Flora im Dickdarm werden die quantitativ meisten Transformationen dort durchgeführt. Dies betrifft die weitere Dekonjugation und die bereits im Dünndarm begonnene Oxidation von Hydroxylgruppen an C3, C7 und C12 über bakterielle $7\alpha/\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen (HSDH), die von zahlreichen Chlostridienspezies, *Bacteroides* oder auch *E. coli* gebildet werden (Ridlon et al. 2006). Im anaeroben Milieu sind die Oxidationsreaktionen besonders nahe der Schleimhautoberfläche möglich, wo ein höheres Redoxpotential vorherrscht (Wilson 2005). Ausschließlich im Dickdarm und nur an bereits dekonjugierten Gallensäuren kann die $7\alpha/\beta$ -Dehydroxylierung stattfinden, bei der aus Chenodeoxycholsäure Lithocholsäure und aus Cholsäure Deoxycholsäure gebildet wird. Über mehrere Zwischenschritte synthetisieren diesen Prozess Eubakterien und Chlostridienspezies (Ridlon et al. 2006).

Die Vorhersage der ablaufenden Prozesse gestaltet sich schwierig, da die verschiedenen Spezies entweder die Fähigkeit sowohl zur Dekonjugation als auch Oxidation und 7-Dehydroxylierung besitzen oder nur bestimmte Reaktionen davon auszuführen können. Zudem spiegeln die *in vitro* bestimmten Metabolismuscharakteristika der Isolate nur zum Teil das Verhalten *in vivo* wider. Das wurde durch Versuche mit gnotobiotischen Mäusen gezeigt, die mit verschiedenen Kombinationen von humanen *in vitro* charakterisierten Bakterien assoziiert wurden. Dabei verdeutlichte sich auch das komplizierte Zusammenspiel verschiedener Bakterienspezies (Narushima et al. 1999a; Narushima et al. 1999b; Narushima et al. 2006).

In vitro konnte für viele humane Isolate eine 7 α -HSDH Aktivität gezeigt werden, mit der aus Cholsäure 7-oxo-Deoxycholsäure entsteht. Dazu gehören *Bacteroides*, *Chlostridia* und *E. coli*. Die Aktivität schwankt zwischen den Isolaten und ist zum Teil wachstumsphasenabhängig oder kann durch Cholsäure induziert werden (Fukiya et al. 2009).

Für den Menschen wurden trotz der weit verbreiteten 7 α -HSDH Aktivität von Bakterien nur wenige 7-oxo-Gallensäuren im Cäcum nachgewiesen (Hamilton et al. 2007). Mögliche Ursache kann die Konkurrenz mit der 7 α -Dehydroxylierung als irreversibler und energetisch für die Bakterien günstigerer Schritt sein (Ridlon et al. 2006; Hamilton et al. 2007). Sekundäre Gallensäuren wie Deoxycholsäure akkumulieren beim Menschen, weil sie in der Leber nicht rehydroxyliert werden können (Ridlon et al. 2006). Somit weist Deoxycholsäure eine längere Halbwertszeit auf und kann sich anreichern. Es wird diskutiert, ob andere Spezies wie die Maus eventuell die Fähigkeit besitzen, es in der Leber zu Cholsäure zu rehydroxylieren (Hofmann et al. 2010).

1.11 Regulation von Gallensäure- und Lipidhomöostase

Cholesterin-, Lipid- und Gallensäurehomöostase unterstehen einem umfassenden Regulationsmechanismus. Hierbei spielen auf transkriptioneller Ebene verschiedene Kernrezeptoren eine Rolle. Hierzu zählen der *Liver X Receptor α* (LXR α , NR1H3), der *Farnesoid X Receptor* (FXR, NR1H4), der *Pregnane X Receptor* (PXR, NR1I2), der *Constitutive Androstane Receptor* (CAR, NR1I3), der *Hepatocyte Nuclear Factor 4 α* (HNF4 α , NR2A1), der *Small Heterodimer Partner* (SHP, NR0B2), der *Peroxisome Proliferative Receptor α* (PPAR α , NR1C1) und der Vitamin-D-Rezeptor (VDR, NR1I1). Bis auf SHP und HNF4 α bilden alle diese Kernrezeptoren Heterodimere mit dem *Retinoid X Receptor* (RXR, RXR) und binden an entsprechende *Response Elements* in der Promotorgegend der Zielgene. HNF4 α bildet Homodimere, die auch über *Response Elements* mit der DNA interagieren. Hingegen besitzt SHP

keine DNA-Bindeeigenschaften, sondern bindet andere Kernrezeptoren wie HNF4 α und hemmt deren stimulierende Wirkung am Promotor (Zollner et al. 2006a).

FXR, auch als Gallensäuresensor bekannt, ist der wichtigste und am besten untersuchte Kernrezeptor mit Wirkung auf die Gallensäurehomöostase. Vor allem seine Rolle als Regulator bei der Cholestase wurde ausgiebig untersucht.

FXR

FXR wurde als ein mit RXR-interagierendes Protein entdeckt, das mit zahlreichen *Hormone Response Elements* interagieren kann (Seol et al. 1995). Da Intermediate des Mevalonat-Pathways – wie Farnesol – als erste Aktivatoren entdeckt wurden, wurde er Farnesoid-X-Rezeptor genannt. Zur Aktivierung des FXR durch Gallensäuren fassen Lefebvre et al. die widersprüchlichen Publikationen zusammen. Für Chenodeoxycholsäure konnte mit verschiedenen Methoden die FXR-Aktivierung nachgewiesen werden, während Ursodeoxycholsäure und Murocholsäure unwirksam sind. Cholsäure und konjugierte Gallensäuren zeigten in zellfreien Coaktivator-Rekrutierungs-Assays keinen Effekt, jedoch unter bestimmten Voraussetzungen in Transfektionsassays (Lefebvre et al. 2009). An CV-1-Zellen und humanen Hepatozyten angestellte Untersuchungen führten zu der Einschätzung, dass Chenodeoxycholsäure > Deoxycholsäure > Lithocholsäure > Cholsäure FXR aktivieren (Parks et al. 1999; Makishima et al. 1999; Liu et al. 2014).

Das *NR1H4*-Gen codiert bei Mensch und Maus für vier Isoformen, die als *FXR α 1* und *FXR α 2* und *FXR β 1* und *FXR β 2* bezeichnet werden. In C57BL/6J-Mäusen wurde die höchste Expression von *Fxr α / β* in der Leber gefolgt vom Ileum nachgewiesen, während in Niere, Magen, Duodenum und Jejunum nur *Fxr β* und in der Nebenniere *Fxr α* exprimiert wurden. In Herz, Lunge und Fett wurde eine schwache Expression und in Gehirn, Milz und Skelettmuskulatur keine Expression aller Isoformen nachgewiesen (Zhang et al. 2003). Studien am Menschen zeigten eine ähnliche Verteilung mit mittleren Leveln von *FXR α / β* im Dünndarm, *FXR α* in Leber und Nebenniere, *FXR β* in Niere und Dickdarm und keiner Expression in Gehirn, Herz, Lunge und Skelettmuskel (Huber et al. 2002).

Eine Aktivierung von FXR erfolgt intrazellulär in Hepatozyten oder Dünndarmzellen über Gallensäuren. Dabei entfaltet FXR seine Wirkung als stimulierender Faktor direkt durch Bindung an den Promotor und dadurch eine erhöhte Transkriptionsrate. FXR wirkt stimulierend auf die Expression der Lebereffluxtransporter, etwa BSEP, MRP2, MDR3 (Mensch) und MDR2 (Maus) sowie auf den Aufnahmetransporter OATP1B3. Auch die Genexpression der an Schritten zur Gallensäurekonjugation beteiligten Enzyme FATP5 und BAAT und des gal-

lensäurebindenden Proteins FABP6 (iBAP/ILBP) im Dünndarm werden stimuliert. Seine hemmende Wirkung entfaltet FXR in der Leber und im Dünndarm indirekt über die Hochregulation von SHP. Dieser hemmt anschließend die Aktivierung der Promotoren durch stimulierende Faktoren wie HNF4 α und LHR, indem es an diese Transkriptionsfaktoren bindet. Auf diese Weise bewirkt FXR indirekt eine Herunterregulierung der Gallensäuresynthesenzyme wie CYP7A1 und CYP8B1, der Gallensäureaufnahme-transporter NTCP und OATP1B1 in der Leber und ASBTs im Ileum (Goodwin et al. 2000; Kalaany et al. 2006; Zollner et al. 2006a).

Ein Zusammenspiel zwischen Gallensäurekonzentration in den Dünndarmzellen und Genexpression in der Leber findet zusätzlich statt. So führt der aktivierte FXR in den Dünndarmzellen zu einer Hochregulation von *Fibroblast Growth Factor* 15 (Maus) oder FGF19 (Mensch). Über das Portalblut gelangt FGF in die Leber und bindet dort unter Beteiligung des Kofaktors β -Klotho an den FGF *receptor isotype* 4 (FGFR4), welcher zur Hemmung der CYP7A1-Transkription führt (Chiang 2009; Stroeve et al. 2010).

Eine vereinfachte Darstellung der FXR-vermittelten Regulationsvorgänge bei Gallensäureüberschuss wird in Abb. 1.4 gegeben.

PXR und CAR

Diese Kernrezeptoren werden als Xenobiotikasensoren angesehen. PXR kann aber auch durch Lithocholat aktiviert werden. Beide sind hoch in der Leber und im Darm exprimiert und weisen ein stark überlappendes Wirkspektrum auf. Sie induzieren Gene, die für die Detoxifizierung von Gallensäuren zuständig sind. Es kommt so zu einer vermehrten Proteinsynthese von CYP3A4, das als Phase-I-Metabolismusenzym über eine Hydroxylierung von Gallensäuren die renale Elimination verbessert. Auch Phase-II-Enzyme wie Sulfotransferasen (SULT) und UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT) werden hochreguliert, was zu einer vermehrten Detoxifizierung der Gallensäuren durch Sulfatierung und Glucuronidierung führt (Trottier et al. 2006).

PPAR α

PPAR α wird stark in Geweben exprimiert, die einen hohen Fettsäuremetabolismus aufweisen. Hierzu zählen Leber, Niere, Herz, Darm und braunes Fettgewebe (Rakhshandehroo et al. 2010). Dieser Rezeptor wird durch die Anwesenheit von Fettsäuren, Eicosanoiden und Leukotrienen aktiviert. Über PPAR α -Aktivierung wird die Taurinkonjugation gehemmt, indem die BAAT herunterreguliert wird und Thioesterasen stimuliert werden, hingegen wird die Sulfatierung und Glucuronidierung von Gallensäuren gefördert (Solaas et al. 2004; Trottier et al.

2006). Auch die Ausscheidung von Phospholipiden in die Galle über MDR2 (Maus)/MDR3 (Mensch) wird stimuliert. Die Gallensäureneusynthese hingegen wird über eine PPAR α -vermittelte Hemmung der CYP7A1-Expression vermindert.

HNF4 α

HNF4 α stellt einen wichtigen basalen Transkriptionsfaktor dar, der für die Differenzierung und Erhaltung von Leberzellen essenziell ist. Er stellt bei vielen Genen die basale Transkription sicher, unter anderem auch für Kernrezeptoren wie FXR, PXR oder RXR α (Trottier et al. 2006). HNF4 α stimuliert die Genexpression der Enzyme der Gallensäuresynthese wie CYP7A1, CYP8B1 und CYP27A1, der Gallensäurekonjugation (BACS, BAAT) sowie der Gallensäuretransporter (NTCP) (Inoue et al. 2006; Zollner et al. 2006a). Reguliert werden diese Gene häufig über andere aktivierte Kernrezeptoren wie etwa SHP, welche die Wirkung von HNF4 α am Promotor hemmen. Gallensäuren können auch direkt die Transkription von HNF4 α hemmen oder – wie für Chenodeoxycholsäure gezeigt – seine Aktivität am Promotor senken (Zollner et al. 2006a).

LXR α

LXR α wird am höchsten in der Leber sowie im Darmtrakt, aber auch stark in Makrophagen, Fettgewebe, Niere, Lunge und Milz exprimiert. Seine Aktivierung erfolgt über Oxysterole. Dieser Kernrezeptor ist an der Regulation des Steroltransports sowie dem Katabolismus und der Ausscheidung von Sterolen beteiligt. Zusammen mit LXR1 erhöht er die *Cyp7a1*-Transkription im Nager – nicht im Menschen – und vermindert so den Cholesterinspiegel im Organismus durch Umsetzung in Gallensäuren. Zusätzlich wird über die Hochregulation des Transporterdimers ABCG5/8 die direkte Ausscheidung von Cholesterol in die Galle unterstützt, während im Dünndarm die Aufnahme vermindert wird. LXR α spielt generell eine Rolle bei der Steuerung der Prozessierung und Speicherung von Fett in der Leber und beeinflusst auch den Glukosestoffwechsel durch Regulation des Glukosetransporters GLUT4 im Fettgewebe (Kalaany et al. 2006; Zollner et al. 2006a).

VDR

Neben seinem namensgebenden Liganden Vitamin D kann VDR auch durch Lithocholat aktiviert werden. Für keine andere Gallensäure wurde dies darüber hinaus nachgewiesen. VDR erhöht die Genexpression der Lithocholat eliminierenden und detoxifizierenden Proteine CYP3A4, MDR3 und Sulfotransferasen (Makishima et al. 2002; Zollner et al. 2006a).

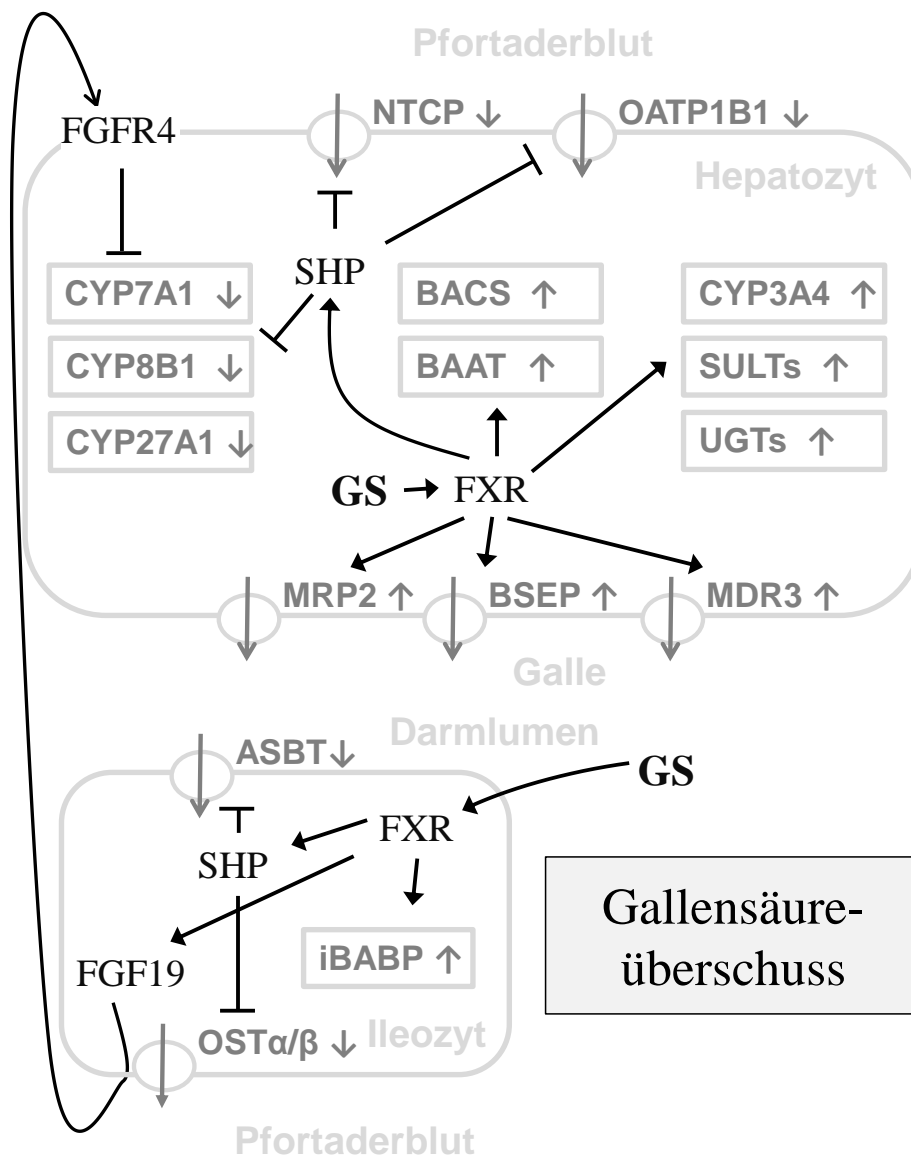


Abb. 1.4 Regulation der Gallensäurehomöostase bei Gallensäureüberschuss

Stark vereinfachte Darstellung der Regulationsvorgänge, die bei vermehrter Gallensäurekonzentration in Leber- und Ileumzellen auftreten. Dargestellt ist dieser Prozess für die humane Situation. Steigende Gallensäurekonzentrationen führen zu einer Aktivierung des Kernrezeptors FXR. Dieser entfaltet seine Wirkung direkt als Heterodimer mit RXR als Transkriptionsfaktor und induziert die Expression von ILBP in den Zellen des Ileums sowie von Effluxtransportern (MRP2, BSEP, MDR2), gallensäurekonjugierenden Enzymen (BACS, BAAT) und Phase-I- und Phase-II-Metabolismusenzymen (CYP3A4, SULTs, UGTs). Hemmende Wirkungen werden indirekt über die Hochregulierung von SHP vermittelt, welcher die Gallensäure-Aufnahmetransportergene der Leber (NTCP, OATP1B1) sowie die Expression von Schlüsselenzymen der Gallensäuresynthese (CYP7A1, CYP8B1, CYP27A1) herunterreguliert. Im Darm wird die Transkriptionsrate der für ASBT und OSTα/β codierenden Gene gesenkt. Auch eine Aktivierung von FXR im Ileum kann über den hochregulierten FGF19, der mit dem Pfortaderblut zur Leber gelangt, FGFR4 vermittelt die Expression von CYP7A1 hemmen.

1.12 Zielsetzung

Nachdem SLC10A5 in die SLC10-Familie eingeordnet wurde, galt er als einziger der zu diesem Zeitpunkt fünf *Orphan Carrier* dieser Genfamilie als ein potenzieller Kandidat, Gallensäuren zu transportieren. Denn zusätzlich zu seiner hohen Sequenzhomologie zu den bekannten Gallensäuretransportern NTCP und ASBT deutete auch sein mit diesen überlappendes Expressionsmuster darauf hin. Dass er im Gegensatz zu diesen beiden gut charakterisierten Plasmamembrantransportern wahrscheinlich intrazellulär lokalisiert sein sollte, bestärkte diese Vermutung sogar eher, waren doch einige intrazelluläre Transportschritte noch nicht aufgeklärt worden.

SLC10A5 war im Rahmen ihrer Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen von Dr. Carla Fernandes kloniert und seine Transportaktivität in *Xenopus laevis* Oozyten untersucht worden, jedoch transportierte er dabei weder Cholsäure noch Taurocholsäure (Diss. Fernandes 2007). Weitere Untersuchungen waren in der Abteilung Gastroenterologie und Hepatologie des University Medical Center Groningen von Dr. Antonella Pellicoro durchgeführt worden, die eine Funktion von SLC10A5 als peroxisomaler Transporter annahm, jedoch aufgrund von unspezifischen Antikörpern keine abschließenden Aussagen zur Lokalisation treffen konnte (Diss. Pellicoro 2008).

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen somit auf Basis dieses Wissenstands die umfassende Charakterisierung des SLC10A5 hinsichtlich seiner Lokalisation und Funktion, mit dem Fokus darauf aufzuklären, ob es sich bei SLC10A5 um einen Gallensäuretransporter handelt.

Die Genexpression bezogen auf ganze Organe war bereits bekannt und sollte durch *In-situ*-Hybridisierungsexperimente bis auf Gewebe- und Einzelzellebene verfeinert und um die SLC10A5-Proteinexpression, bestimmt in Western-Blot-Analysen und immunhistologischen Untersuchungen, ergänzt werden. Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation wurden Doppelimmunmarkierungen mit SLC10A5-Antikörpern und Organellenmarkern in transfizierten Zellen und Gewebe geplant.

Zur Aufklärung der Funktion sollten *In-vitro*-Transportstudien am stabil SLC10A5-transfizierten Zellmodell erfolgen. Gleichzeitig sollte die *Slc10a5*-Knockout-Maus als erstes *In-vivo*-Modell etabliert werden. Hierfür wurde geplant, zunächst eine allgemeine Phänotypisierung vorzunehmen, durch eine Rückkreuzung ein kongenes Mausmodell zu generieren und dieses dann hinsichtlich seines Gallensäurestoffwechsels umfassend zu untersuchen.

2 Material

2.1 Molekularbiologie

2.1.1 PCR-Primer

Name	Sequenz 5'→3'	T _m	Verwendung
P5-PCR-wt-7-f	GACCAACCAAACCCAGCTGTTAC	65	Genotypisierung der <i>Slc10a5</i> -Knockout-Maus
P5-PCR-wt-8	CAGCACTTTAGGATCCTCTA	56	
P5-PCR-m_L-r	CAAATGCTCCAGGGAGGTAGCCA	66	
P5-PCR-m-Neo3a-f	GCAGCGCATCGCCTTCTATC	63	
UP7-F	GGCTATCTCTTTGCTCTGCTTC	60	Expression humaner <i>SLC10A5</i>
UP7-R	GCTAAATTGGCCTTGGACTGTG	60	
G3PDH-F1	ACGGGAAGCTCACTGGCATG	61	<i>GAPDH</i> -Kontrolle (<i>Housekeeper</i>)
G3PDH-R4	CCACCACCCTGTTGCTGTAG	61	
mP5_insituSonde_f	ATACCAACCTATGGAGGTGCCAC	65	Maus <i>In-situ</i> -Sonde_1
mP5_insituSonde_r	ATCGAGGTAGGCTCTCCTGGAAC	66	
mP5_insitu_2_f	CCGGATGGGACTAGTGTCTCTGAG	67	Maus <i>In-situ</i> -Sonde_2
mP5_insitu_2_r	ATCTCCTCACCTCCCATGTCAAGC	67	
mP5Insitu3_f	CTGGGTAGGCACACATGGTT	60	Maus <i>In-situ</i> -Sonde_3
mP5Insitu3_r	CAACGATGTTTTCTTCCGTCCTTG	64	
mP5Insitu4_f	CATTAAACACAAGATGCCTGCG	60	Maus <i>In-situ</i> -Sonde_4
mP5Insitu4_r	CCAGAAGCCCCAATAGAAACAC	62	
mP5 180bpfragment_f	GGCTTAGCAGGTGCATTTACAG	64	Expression muriner <i>Slc10a5</i> (cDNA-Ebene)
mP5 180bpfragment_r	AGCCAAGTAGATGCCACGAAC	64	

2.1.2 Real-Time-PCR-Assays

Verwendete *Gene Expression Assays* (Applied Biosystems)

Genname	Taq Man Assay Nummer	Exongrenze (NCBI Ref.Seq.)
<i>Abcb1a</i> (Maus)	Mm00440761_m1	20-21
<i>Abcb11</i> (Ratte)	Rn00582179_m1	-
<i>ACTB</i> (Mensch)	Hs01060665_g1	2-3
<i>Actb</i> (Ratte)	Rn00667869_m1	4-5
<i>Hprt1</i> (Maus)	Mm00446968_m1	6-7
<i>Osta</i> (Maus)	Mm00521530_m1	1-2
<i>Ostβ</i> (Maus)	Mm00619242_m1	2-3
<i>Slco1a1</i> (Maus)	Mm00649796_m1	2-3
<i>Slc10a1</i> (Ratte)	Rn00566894_m1	1-2
<i>Slc10a2</i> (Maus)	Mm00488258_m1	1-2
<i>SLC10A5</i> (Mensch)	Hs01049585_s1	-
<i>Slc10a5</i> (Maus)	Mm02345249_s1	-
<i>Slc10a5</i> (Ratte)	Rn02585862_s1	-

2.1.3 DNA-Polymerasen

Phusion High-Fidelity DNA Polymerase
 DyNAzymeII DNA Polymerase
 Taq DNA Polymerase (recombinant)

Finnzymes, Espoo, FI
 Finnzymes, Espoo, FI
 Fermentas, St. Leon-Rot

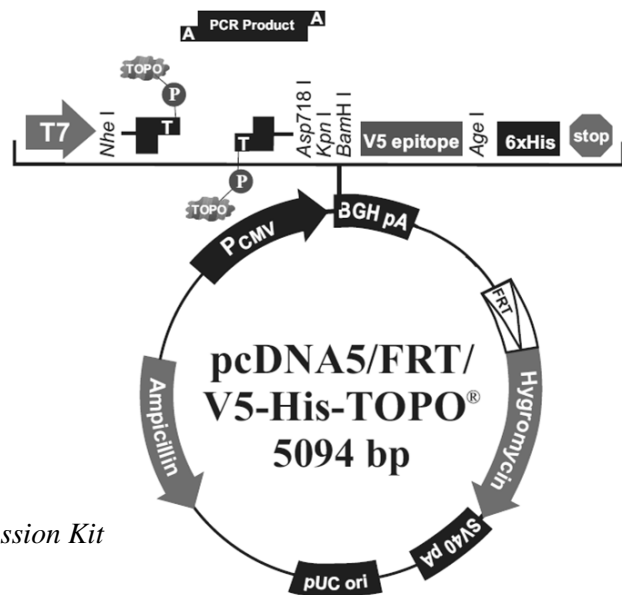
2.1.4 Restriktionsenzyme

<i>Apal</i>	Buffer Blue	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Nco</i>	Tango Buffer	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>NotI</i>	Buffer Orange	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>SacI</i>	Buffer Blue	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Sall</i>	Buffer Orange	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.5 Vektoren

pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe)

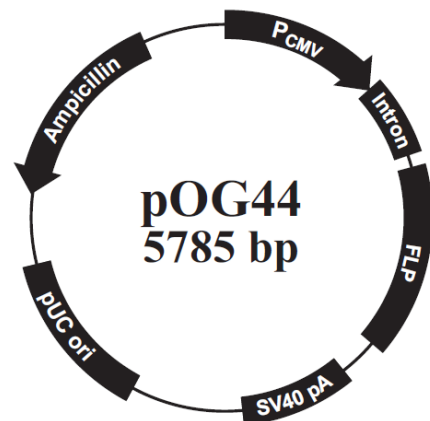
Gesamtlänge: 5.094 bp
 CMV-Promotor, T7-Promotor,
 TOPO-Klonierungsstelle, V5-Epitop,
 Polyhistidin(6x His)-Region, BGH-PolyA,
 FRT-site, SV40 early PolyA, pUC origin,
 bla-Promotor, Hygromycinresistenz,
 Ampicillinresistenz



Quelle: pcDNA5/FRT/V5-His TOPO® TA Expression Kit
 User Manual, Invitrogen, Karlsruhe

pOG44 (Invitrogen, Karlsruhe)

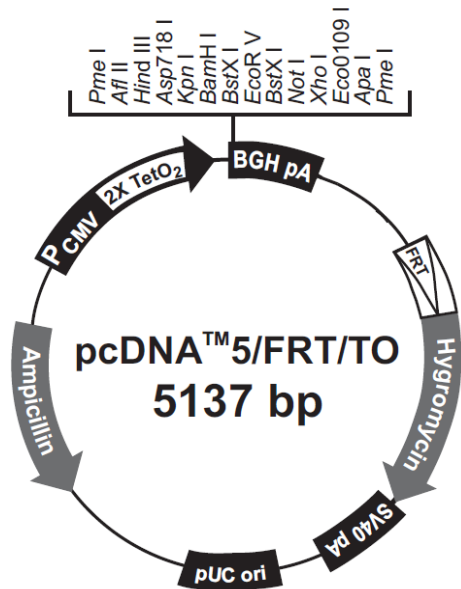
Gesamtlänge: 5.785 bp
 CMV-Promotor, synthetisches Intron,
 Leserahmen der Flp Recombinase (FLP), SV40, PolyA,
 pUC origin, bla-Promotor, Ampicillinresistenz



Quelle: pOG44 Flp-recombinase expression vector
 designed for use with the Flp-In™ System
 User Guide, Invitrogen, Karlsruhe

pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen, Karlsruhe)

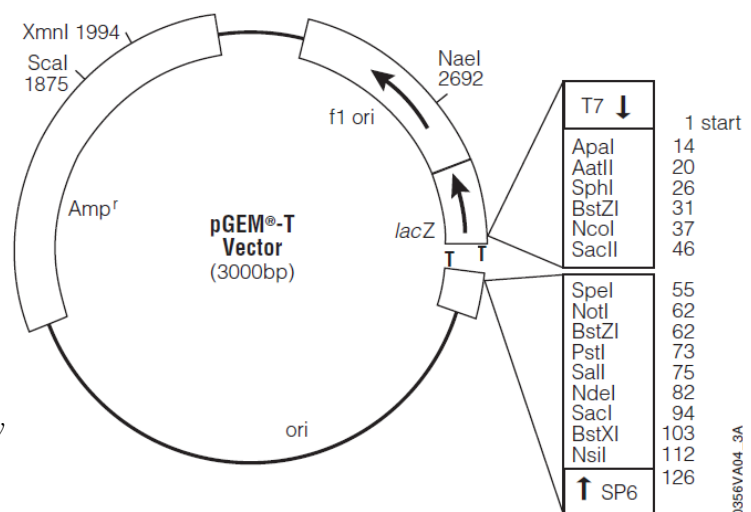
Gesamtlänge: 5.137 bp
 CMV-Promotor, TATA-Box, 2x Tetracyclin-Operon (TetO₂), BGH PolyA, FRT site, SV40 early PolyA, pUC origin, bla-Promotor, Hygromycinresistenz, Ampicillinresistenz



Quelle: pOG44 Flp-recombinase expression vector designed for use with the Flp-In™ System User Guide, Invitrogen, Karlsruhe

pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, USA)

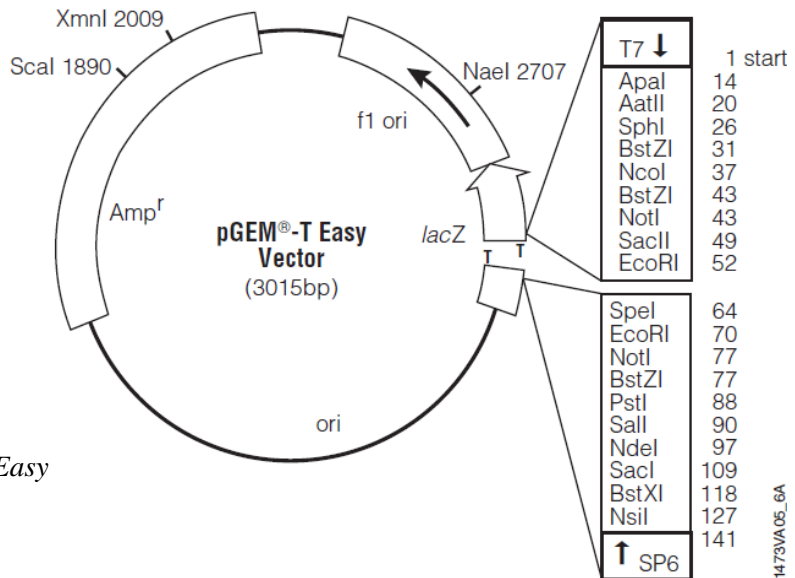
Gesamtlänge: 3.015 bp
 T7 RNA-Polymerase Promotor, SP6 RNA-Polymerase Promotor, Lac-Operon, Ampicillinresistenz



Quelle: pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual, Promega, USA

pGEM-T Vector (Promega, Madison, USA)

Gesamtlänge: 3.000 bp
T7 RNA-Polymerase Promotor,
SP6 RNA-Polymerase Promotor,
Lac-Operon, Ampicillinresistenz



Quelle: pGEM®-T and pGEM®-T Easy
Vector Systems
Technical Manual, Promega, USA

2.1.6 Verwendete SLC10A5-/Slc10a5-Konstrukte

Die folgenden SLC10A5-/Slc10a5-Konstrukte wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen hergestellt.

hSLC10A5-pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO (hSLC10A5-V5)

Der vollständige Leserahmen des humanen *SLC10A5* ohne Stopcodon wurde von Frau Stephanie Schmidt aus dem hSLC10A5-pcDNA6.2/c-EmGFP-Plasmid in den pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO-Vektor subkloniert.

hSLC10A5-EmGFP-pcDNA5/FRT/TO-TOPO (hSLC10A5-GFP)

Der vollständige Leserahmen des humanen *SLC10A5* inklusive EmGFP wurde von Frau Stephanie Schmidt aus dem hSLC10A5-pcDNA6.2/c-EmGFP-Plasmid in den pcDNA5/FRT/TO-TOPO-Vektor subkloniert.

hSLC10A5-Flag-pcDNA5/TO (hSLC10A5-Flag)

Über eine gezielte Mutagenese wurde die Sequenz für das Flag-Epitop (DYKDDDDK) an das 3'-Ende des *hSLC10A5*-Leserahmens angefügt und in den pcDNA5/TO-Vektor kloniert (Diss. Fernandes 2007).

rSlc10a5-Stopp-pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO (rSlc10a5)

Der vollständige Leserahmen des *Slc10a5* der Maus inklusive Stoppcodon wurde von Frau Dr. Carla Fernandes in den pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO-Vektor kloniert.

mSlc10a5-pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO (mSLC10A5-V5)

Der vollständige Leserahmen des *Slc10a5* ohne Stopcodon wurde von Frau Jessica Kahn aus Leber-cDNA einer FVB-Maus in den pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO-Vektor kloniert.

2.1.7 Elektrophorese

10 x TAE-Puffer

Tris	400 mM	48,4 g
Essigsäure		11,4 ml
0,25 M EDTA, pH 8,0	100 mM	40 ml
ddH ₂ O		ad 1 l

LB-Medium

Trypton	10 g	pH 7 mit NaOH einstellen
NaCl	10 g	vor Gebrauch Selektionsanti-
Hefeextrakt	5g	biotikum zufügen
ddH ₂ O	ad 1 l	

LB-Agar

LB-Medium	1 l	autoklavieren, bei 60 °C
Agar-Agar	20 g	Selektionsantibiotikum zufügen, Platten gießen

2.1.8 Kommerziell erhältliche Kits und Materialien

HiYield PCR Clean-up / Gel Extraction Kit	SLG, Gauting
QiaPrepSpin Mini Prep Kit	Qiagen, Hilden
TriReagent	Sigma, Taufkirchen
RNAlater Solution	Ambion, Carlsbad, USA
RNase away Reagent	Ambion, Carlsbad, USA
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Waldbronn
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperScriptIII First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen, Carlsbad, USA
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden

2.2 Zellkultur

Zelllinien

HEK Flp-In T-REX 293 (Invitrogen, Karlsruhe)

Bei den HEK Flp-In T-REX 293 Zellen handelt es sich um *Human Embryonic Kidney Cells* 293 (HEK293), die stabil integriert eine FRT-site (aus pFRT/lacZeo-Vektor) besitzen und konstitutiv den Tet-Repressor (aus pcDNA6/TR-Vektor) bilden. Die Zellen wachsen adhärent einschichtig und zeichnen sich durch wenig Zytoplasma und kurze Ausläufer aus. Sie können mit Zeocin auf die FRT-site und mit Blasticidin auf das Tet-Repressorgen selektioniert werden.

HepG2

Die HepG2-Zellen (Human Hepatoma Cell Line) wurden ursprünglich 1979 aus dem hepatozellulären Karzinom eines fünfzehn Jahre alten argentinischen Jungen isoliert (Aden et al.

1979). Sie wachsen adhären e einschichtig sowie in kleinen Aggregaten und haben sich teilweise die Eigenschaften von Leberzellen erhalten. Die HepG2-Zellen wurden dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie von Herrn Dr. Ayub Darji aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt.

Puffer und Medien

HEK293-Medium

DMEM (<i>high glucose</i>)		87 ml
Hams F12		87 ml
FKS	10 %	20 ml
L-Glutamin (200 mM)	4 mM	4 ml
Pen/Strep (10000 I. E./ml / 10 mg/ml)		5 ml

HepG2-Medium

DMEM (<i>high glucose</i>)		174 ml
Hams F12		87 ml
FKS	10 %	20 ml
L-Glutamin (200 mM)	4 mM	4 ml
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml, 10 mg/ml)		5 ml

HEPES-Puffer

HEPES	18 mM	4,77 g	pH 7,3 einstellen
NaCl	120 mM	7,07 g	
KCl	5 mM	0,4 g	
KH ₂ PO ₄	0,4 mM	0,06 g	
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	0,3 mM	0,08 g	
Glucose	6 mM	1 g	
Phenolrot	0,03 mM	0,01 g	
EDTA	1 mM	0,37 g	
ddH ₂ O		ad 1 l	

Trypsinlösung

Trypsin	0,025 %	25 mg
HEPES-Puffer		100 ml

Trypanblau

Trypanblau	4 %	4 g
NaCl	0,9 %	0,9 g
ddH ₂ O		ad 100 ml

Beschichtungsmedium (HEK293-Zellen)

Poly-L-Lysin	100 µg/ml
--------------	-----------

Material

Beschichtungsmedium (HepG2-Zellen)

Collagen (aus dem Rattenschwanz)	80 µl
Ethanol reinst	1920 µl

2.3 Proteinisolation

Proteo Extract Native Membrane Protein Extraction Kit	Calbiochem, La Jolla, USA
ProteoJet Mammalian Cell Lysis Reagent	Fermentas, St. Leon-Rot

Sucroselösung 1 M

Sucrose	1 M	342,3 g
ddH ₂ O		ad 1000 ml

Tris/MOPS 0,1 M

Tris	0,1 M	12,1 g	Tris in 500 ml H ₂ O lösen pH 7,4 mit MOPS einstellen
MOPS		x g	
ddH ₂ O		ad 1000 ml	

EGTA/Tris 0,1 M

EGTA	0,1 M	38,1 g	EGTA in 500 ml H ₂ O lösen pH 7,4 mit Tris einstellen (pH-Papier-verwenden)
Tris		x g	
ddH ₂ O		ad 1000 ml	

Intrazellulärpuffer IB_C

Sucroselösung 1 M	20 ml
Tris/MOPS 0,1 M	10 ml
EGTA/Tris 0,1 M	1 ml
ddH ₂ O	ad 100 ml

2.4 Western Blot

Puffer

4x-Lämmli-Puffer

Glycerin	40 %	4 g
SDS	8 %	0,8 g
Bromphenolblau	0,008 %	0,8 mg
1 M Tris (pH 6,8)	0,25 M	2,5 ml
β-Mercaptoethanol	20 %	2 ml

Transferpuffer

10x Tris-Tricine-SDS-Electrophoresis Buffer	50 ml
100 % Ethanol	100 ml
ddH ₂ O	ad 500 ml

10x TBS

NaCl	1370 mM	12,1 g	pH 8 mit HCl einstellen
Tris	100 mM	121,2 g	
ddH ₂ O	ad 1 l		

Material

TBST

10x TBS		100 ml
ddH ₂ O		900 ml
Tween20	0,05 %	500 µl

Blockierlösung

Milchpulver	5 %	2,5 g
TBST		ad 50 ml

Kommerziell erhältliche Agenzien

Hybond ECL (Nitrozellulose Membran)	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
Rotilabo Blottingpapiere 0,35 mm	Roth, Karlsruhe
Roti-Mark Western Marker	Roth, Karlsruhe
Roti-Mark Western HRP-Konjugat	Roth, Karlsruhe
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder SM1811 (10, 15, 27, 35, 55, 70, 100, 130, 250 kDa)	Fermentas, St. Leon-Rot
Rotilumin 1 und 2	Roth, Karlsruhe
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
Rodinal B&W Film Developer (1 : 5 mit H ₂ O)	Agfa, Leverkusen
Hypam Schnellfixierer (1 : 25 mit H ₂ O)	Ilford, Cheshire, GB

2.5 Mikroskopische Verfahren

2.5.1 Immunhistologische Untersuchungen

Puffer

10x Tris-Puffer

Tris-Base	30,25 g	pH 7,6 mit HCl einstellen
NaCl	90 g	
ddH ₂ O	ad 1 l	

Waschpuffer

10x Tris-Puffer	100 ml	Verdrängungspipette für Triton verwenden
ddH ₂ O	900 ml	
Triton-X-100	250 µl	

Citratpuffer Stammlösung A

Citronensäure (C ₆ H ₈ O ₇ ·xH ₂ O)	2,1 g
ddH ₂ O	100 ml

Citratpuffer Stammlösung B

Trinatriumcitrat (C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ ·2H ₂ O)	7,35 g
ddH ₂ O	250 ml

Material

Citratpuffer

Stammlösung A	7 ml
Stammlösung B	41 ml
ddH ₂ O	ad 500 ml

Kommerziell erhältliche Agenzien

Vecstatin Elite ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Peroxidase-Substratkit AEC	Biologo, Kronshagen
DAKO-Pen	DAKO Denmark, Glostrup, DK
Polyclonal Goat Anti-Rabbit	DAKO Cytomatic, Glostrup, DK
Immunoglobulins/Biotinylated E 0432	

2.5.2 Immunfluoreszenzuntersuchungen an Cryoschnitten

Puffer

4%iges PFA (Paraformaldehyd)

Paraformaldehyd	4 %	4 g	PFA in 60°C heißem ddH ₂ O unter NaOH-Zugabe lösen pH 7 einstellen mit HCl
ddH ₂ O		90 ml	
10x PBS		10 ml	

Sucroslösung

Sucrose		20 g
0,1 M Phosphatpuffer		ad 100 ml

Phosphatpuffer Stocklösung A

NaH ₂ PO ₄ ·xH ₂ O	0,2 M	27,6 g
ddH ₂ O		ad 1 l

Phosphatpuffer Stocklösung B

Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	0,2 M	53,6 g
ddH ₂ O		ad 1 l

0,1 M Phosphatpuffer

Stocklösung A	720 ml
Stocklösung B	280 ml
ddH ₂ O	1000 ml

Blockierlösung

0,1 M Phosphatpuffer		4,5 ml
Serum (aus Spezies des 2.AK)	10 %	500 µl
Triton-X100	0,3 %	15 µl

Antikörperlösung

0,1 M Phosphatpuffer		4,9 ml
Serum (aus Spezies des 2.AK)	2 %	100 µl
Triton-X100	0,1 %	5 µl

Kommerziell erhältliche Agenzien

Ziegenerum	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eselserum	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.5.3 Immunfluoreszenzuntersuchungen an Zellen

10x PBS

NaCl	80 g	pH 7,4 mit HCl einstellen,
KCl	2 g	autoklavieren
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	26,8 g	
KH ₂ PO ₄	2,4 g	als 1x Gebrauchslösung
dd H ₂ O	ad 1 l	verwenden

2%iges PFA (Paraformaldehyd)

Paraformaldehyd	2 %	2 g	PFA in 60°C heißem ddH ₂ O
ddH ₂ O		90 ml	unter NaOH Zugabe lösen,
10x PBS		10 ml	pH 7 einstellen mit HCl

Puffer A

1x PBS	100 ml
Glycin	150,2 mg

Puffer A + 0,2 % Triton X-100 (je 24-Well-Platte)

Puffer A	10 ml	Verdrängungspipette für
Triton-X-100	20 µl	Triton verwenden

Blockierlösung (je 24-Well-Platte)

Puffer A		22 ml
BSA	1 %	220 mg
Serum (Spezies des 2. AK)	4 %	880 µl

DAPI/Methanol 1 : 5000

DAPI (1mg/ml ddH ₂ O)	1 : 5000	10 µl
Methanol		50 ml

Digitonin-Permeabilisierungspuffer

Kaliumacetat	75 mM	147 µg
Magnesiumacetat	2,5 mM	11 µg
Calciumchlorid	1,8 mM	5 µg
HEPES	25 mM	119 µg
Digitonin		1,2 mg

2.6 Primärantikörper

Name	Epitop	gegen	Spezies	Hersteller
rSLC10A5-Ak	C-Terminus, Ratte CKRPLLSTENEKAPLV	Ratte	polyklonal Kaninchen	Eurogentec, Seraing, B (Auftrags-Ak)
SLC10A5 antibody C-terminal region (hSLC10A5-Ak)	4. intra-zellulärer Loop bis 9. TMD	Mensch	polyklonal Kaninchen	Aviva Systems Biology, San Diego, USA
Anti-SLC10A5 (hSLC10A5-Ak)	2. Hälfte N-Terminus und 1. TMD	Mensch	polyklonal Kaninchen	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-ATP Synthase β antibody (ATP-Synthase-Ak)	intakte Rattenmito- chondrien	Mensch, Ratte, Maus	monoklonal Maus	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-Calnexin (Calnexin-Ak)	C-Terminus humanes Calnexin (AS 573-592)	Mensch, Ratte, Maus, Hund	polyklonal Kaninchen	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti Catalase Clone CAT505 (Katalase-Ak)	aufgereinigte humane Erythrozytenkatalase	Mensch, Ratte, Maus, Rind	monoklonal Maus	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-COX IV – mito- chondrial loading control (COX IV-Ak)	aufgereinigter mitochond- rialer Komplex IV Rind	Mensch, Ratte, Maus, Rind, Hamster	monoklonal Maus	Abcam, Cam- bridge, GB
Giantin Golgi-Marker (Giantin-Ak)	Ratten-Giantinprotein	Mensch, Ratte	monoklonal Maus	Abcam, Cam- bridge, GB
Mouse anti-Human Transferrin Receptor (TfR-Ak)	humaner Transferrinreze- ptor AS 3-28	Mensch, Ratte, Maus, Huhn, Chin. Hamster	monoklonal Maus	Invitrogen, Camarillo, USA
Anti-GAPDH (GAPDH-Ak)	C-Terminus HQVVSSDFNSDT	Mensch, Maus, Hund	polyklonal Ziege	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-Flag (Flag-Ak)	DYKDDDDK	Flag-Tag	polyklonal Kaninchen	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-GFP (GFP-Ak)	rekombinantes GFP	GFP-Tag	monoklonal Maus	Roche, Mann- heim
Anti-V5 (Maus-V5-Ak)	GKPIPPLLGLDST	V5-Tag	monoklonal Maus	Invitrogen, Camarillo, USA
Anti-V5 antibody (Kaninchen-V5-Ak)	GKPIPPLLGLDST	V5-Tag	polyklonal Kaninchen	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.7 Sekundärantikörper

Name	gegen	Spezies	Hersteller
Alexa Fluor 488 Ziege-anti-Kaninchen	Kaninchen IgG (H+L)	polyklonal Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 488 Ziege-anti-Maus	Maus IgG (H+L)	polyklonal Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 555 Ziege-anti-Kaninchen	Kaninchen IgG (H+L)	polyklonal Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
Cy3 Ziege-anti-Kaninchen	Kaninchen IgG (H+L)	polyklonal Ziege	Dianova, Hamburg
Cy3 Ziege-anti-Maus	Maus IgG (H+L)	polyklonal Ziege	Dianova, Hamburg
Esel-anti-Kaninchen HRP-gekoppelt	Kaninchen IgG	Esel	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Schaf-anti-Maus HRP-gekoppelt	Maus IgG	Schaf	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Kaninchen-anti-Ziege HRP-gekoppelt	Ziege IgG (H+L)	polyklonal Kaninchen	Zymed Laboratories, Invitrogen, Carlsbad, USA
Ziege-anti-Maus Peroxi- dase gekoppelt	Maus IgG	polyklonal Ziege	Rockland, Gilbertsville, USA
Ziege-anti-Kaninchen Peroxidase gekoppelt	Kaninchen IgG	polyklonal Ziege	Rockland, Gilbertsville, USA
DAPI	Zellkernfärbung	Farbstoff	Roche Diagnostics, Mannheim

2.8 *In-situ*-Hybridisierung

Polymerasen/Ribonukleasen

SP6 RNA-Polymerase	Promega, Madison, USA
T7 RNA- Polymerase	Promega, Madison, USA
mit 5 x Transkriptions-Puffer und 10 mM DTT	
Ribonuklease A aus <i>bovine pancreas</i> (RNase A)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ribonuklease T1 aus <i>Aspergillus oryzae</i> (RNase T1)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Puffer

DEPC-H₂O

DEPC	0,1 %	1 ml	über Nacht rühren,
ddH ₂ O		1 l	autoklavieren

1 M MgCl₂

MgCl ₂	81,4 g
DEPC-H ₂ O	400 ml

PBSM

PBS-Tablette (Sigma)	1
DEPC-H ₂ O	200 ml
1 M MgCl ₂	1 ml

Material

20x SSC

Natriumcitrat	88,23 g	pH 7,0
NaCl	175,29 g	über Nacht rühren,
ddH ₂ O	ad 1 l	autoklavieren
DEPC-H ₂ O	1 ml	

10x TNMT

Tris-HCL	121,1 g	pH 7,5
NaCl	58,4 g	
MgCl ₂	4,17 g	
ddH ₂ O	ad 1 l	
Triton-X-100	5 ml	

5x NTB

Tris-HCl	60,5 g	pH 9,6
NaCl	29,2 g	
ddH ₂ O	ad 1 l	

1x NTB

5x NTB	20 ml
ddH ₂ O	75 ml
1 M MgCl ₂	5 ml

4%ige Paraformaldehydlösung

Paraformaldehyd	20 g	bei 70 °C rühren,
1x PBSM	500 ml	NaOH zugeben,
4 N NaOH	tropfenweise	bis Lösung klar wird

Proteinase K

Proteinase K	10 mg	aliquotieren
1x PBSM	2,5 ml	-20 °C

RNAse A / RNAse T1 Stammlösung

2x SSC	10 ml	aliquotieren
RNAse A (25 mg/1 ml)	120 µl	-20 °C
RNAse T1 (10 ⁵ I. E./1 ml)	1 µl	

1M Levamisol

Levamisol	2,4 g
1x NTB	10 ml

2.9 Radioaktive Transportmessungen

Verwendete radioaktiv-markierte Gallensäuren

Substanz	spezifische Aktivität (Ci/mmol)	Konzentration (μ M)	fmol/dpm
[3 H]Cholat	30	33,33	0,01515
[3 H]Deoxycholol	38	26,3	0,011962
[3 H]Glycochenodeoxycholol	14	71,43	0,03247
[3 H]Glycodeoxycholol	29	34,48	0,01567
[3 H]Glycoursodeoxycholol	14	71,43	0,3247
[3 H]Sarcosincholat	10	100	0,045455
[3 H]Taurochenodeoxycholol	10	100	0,045455
[3 H]Taurocholol	30	33,33	0,01515
[3 H]Taurodeoxycholol	29	34,48	0,01567
[3 H]Tauroursodeoxycholol	14	71,43	0,3247
[3 H]Ursodeoxycholol	12	83,33	0,03788

Die verwendeten Tritium-markierten Gallensäuren wurden zur Verfügung gestellt durch Herrn Prof. Dr. Alan F. Hofmann, University of California, San Diego, USA.

Verwendete Gallensäuren

Cholat (freie Gallensäure)	Sigma, St. Louis, USA
Deoxycholol (freie Gallensäure)	Sigma, St. Louis, USA
Glycochenodeoxycholol (Na-Salz)	Sigma, St. Louis, USA
Glycodeoxycholol (freie Gallensäure)	Sigma, St. Louis, USA
Glycoursodeoxycholol (Na-Salz)	Sigma, St. Louis, USA
Taurochenodeoxycholol (Na-Salz)	Sigma, St. Louis, USA
Taurocholol (Na-Salz)	Roth, Karlsruhe
Taurodeoxycholol (Na-Salz)	Sigma, St. Louis, USA
Tauroursodeoxycholol (Na-Salz)	Sigma, St. Louis, USA
Ursodeoxycholol (Na-Salz)	Calbiochem, La Jolla, USA

Puffer zur Messung an Digitonin-permeabilisierten HEK293-Zellen

Intrazellulärpuffer

Kaliumtartrat	110 mM	4,139 g
Glukose	5 mM	0,198 g
BSA	0,2 %	0,400 g
Kalziumchlorid	200 μ M	5,80 mg
Ascorbinsäure	1 mM	35,2 mg
PIPES	20 mM	1,20 g
ddH ₂ O		ad 200 ml

Digitonin-Puffer

Digitonin	15 μ M	0,461 mg	in 500 μ l Ethanol vorgelöst
Intrazellulärpuffer		ad 25 ml	

Material

Transportpuffer

Mg-ATP	5 mM	42,5 mg
Intrazellulärpuffer		16 ml

CaCl₂-Lösung

CaCl ₂	200 mM	0,294 g	pH 7,4 einstellen mit KOH
ddH ₂ O	10 ml		

Puffer zur Messung an intakten HEK293-Zellen

Na⁺-haltiger Transportpuffer

NaCl	142,9 mM	8,35
KCl	4,7 mM	0,35 g
MgSO ₄ ·7xH ₂ O	1,2 mM	0,296 g
KH ₂ PO ₄	1,2 mM	0,163 g
HEPES	20 mM	4,777 g
CaCl ₂ (200mM Lösung)	1,8 mM	9 ml

Na⁺-freier Transportpuffer

Cholinchlorid	142,9 mM	19,95 g
KCl	4,7 mM	0,35 g
MgSO ₄ ·7xH ₂ O	1,2 mM	0,296 g
KH ₂ PO ₄	1,2 mM	0,163 g
HEPES	20 mM	4,777 g
CaCl ₂ (200 mM-Lösung)	1,8 mM	9 ml

Lyse und Proteinbestimmung

Lysepuffer

NaOH	1 N	40,01 g
SDS	0,1%	1 g
ddH ₂ O		ad 1 l

Lösung C (je 96-Well Platte)

4% Na ₂ CO ₃	20 ml
1% CuSO ₄	0,8 ml
2% K-Na-Tartrat	0,8 ml

Folin-Lösung (je 96-Well Platte)

Folin Ciocalteu's phenol reagent	1 ml
ddH ₂ O	3 ml

2.10 Fluoreszierende Gallensäuren

Cholsäure-NBD (S3732)

Taurocholsäure-NBD (S4148)

Marion Hoechst Roussel,
Frankfurt a. M.

Marion Hoechst Roussel,
Frankfurt a. M.

NBD = 4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol

Absorptionsmaximum: 464 nm, Emissionsmaximum: 512 nm

2.11 Versuchstiere

2.11.1 Mäuse

C57BL/6Nx129SvEvBrd F1
B6.129S5-Slc10a5^{tm1Lex}

TIGM, College Station, TX, USA
eigene Zucht, Zentrales Tierlabor,
Justus-Liebig-Universität Gießen
Taconic, Lille Skensved, DK

C57BL/6NTac

Die Mäuse wurden im Zentralen Tierlabor (ZTL) der Justus-Liebig-Universität und in der Tierhaltung des Biomedizinischen Forschungszentrums (BFS) unter SPF-Bedingungen gehalten. Die Haltung erfolgte in einem zwölfstündigen Hell-/Dunkel-Zyklus bei 22 °C und 50 % relativer Luftfeuchtigkeit. Wasser und Futter (1324 Ratte/Maus Haltung 10 mm Pellets, Altromin) stand den Mäusen *ad libitum* zur Verfügung.

Die Galleausscheidungsversuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen unter dem Aktenzeichen GI18/11 Nr 99/2012 genehmigt.

2.11.2 Ratten

Bei dem für die Immunhistologie verwendeten Rattengewebe handelte es sich um überschüssiges Material von erwachsenen Wistar-Ratten, die in genehmigten Versuchen des Instituts für Veterinärphysiologie der Justus-Liebig-Universität eingesetzt wurden. Dort wurden die Tiere in Polykarbonat-TypIV-Käfigen bei 22,5°C, 50 % relativer Luftfeuchtigkeit und zwölfstündigem Hell-/Dunkel-Rhythmus gehalten. Futter (Altromin 1320, Altromin) und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung.

Lebergewebealliquots von 200 bis 250 g schweren Sprague-Dawley-Ratten nach Gallengangligatur oder LPS-Behandlung wurden bereits von Frau Stephanie Schumacher in ihrer Dissertation auf Lebertransporterexpression untersucht und freundlicherweise von Herrn Dr. Markus Donner aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt (Diss. Schumacher 2011).

2.11.3 Genotypisierung der *Slc10a5*-Knockout-Maus

DNA-Isolation

Lysepuffer 10x

NaOH	250 mM	1 g	als 1x verwenden
EDTA-Na	2 mM	74,46 mg	
ddH ₂ O		ad 100 ml	

Neutralisationspuffer 10x

Tris-HCl	400 mM	6,3 g	als 1x verwenden
ddH ₂ O		ad 100 ml	

2.11.4 Galleausscheidungsversuch *Slc10a5*-Knockout-Maus

Ketamin 100 mg/ml	CP-Pharma, Burgdorf
Xylazin 2 %	Ceva, Düsseldorf
PTFE-Schlauch 0,2 mm x 0,4 mm	Bola, Grünsfeld
Multivette 600 (EDTA-Blut Röhrchen)	Sarstedt, Nümbrecht
20 G und 25 G Kanüle	Henke Sass Wolf, Tuttlingen
1 ml Spritze	Braun, Melsungen

2.12 Verbrauchsmaterialien

12,5-cm ² -Kulturschalen	BD Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
24-Well-Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
25-cm ² -Kulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
75-cm ² -Kulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
96-Well-Mikrotiterplatten	Sarstedt, Nümbrecht
CryoPure Gefäße, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen, 12 mm	Roth, Karlsruhe
Einmalhandschuhe	Roth, Karlsruhe
Einmalspritzen	Braun, Melsungen
Einwegkanülen	Henke Sass Wolf, Tuttlingen
Einwegskalpell	Megro, Wesel
Filterpapier	Roth, Karlsruhe
MicroAmp Optical 96 Well Reaction Plate	Life Technologies, Darmstadt
Minivial (PonyVial (H/I)	Perkin Elmer, Waltham, USA
Nitrilhandschuhe	Roth, Karlsruhe
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Objektträger Superfrost Plus	Menzel, Braunschweig
Parafilm	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten, Glas	MAGV, Rabenau
Pasteurpipetten, Plastik	Brand, Wertheim
PCR-tubes, 0,2 ml	Nerbe Plus, Winsen/Luhe
Petrischalen	Nerbe Plus, Winsen/Luhe
Pipettenspitzen	Nerbe Plus, Winsen/Luhe
Reaktionsgefäße (1,5; 2; 15; 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Einmalpipetten (5; 10; 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter, 0,22 µm	Sarstedt, Nümbrecht
UVetten	Eppendorf, Hamburg
Zellschaber, 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht

2.13 Chemikalien

Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose, Ultra Pure	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Steinheim
Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Fluka, Buchs, CH
Collagen (aus dem Rattenschwanz)	Serva, Heidelberg
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Roche, Mannheim
Deionisiertes Formamid	Sigma, Steinheim
Denhardt's Solution 50x (BFP)	Sigma, Steinheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Dextransulfat	Roth, Karlsruhe
D-Glucose	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco (Life Technologies), Paisley, GB
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Essigsäureanhydrid	Merck, Darmstadt
Ethanol (99,5 %)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma, Steinheim
Folin & Ciocalteu's Phenol Reagenz	Sigma, Taufkirchen
Formamid	Merck, Darmstadt
Gel Red	Biotium, Hayward, USA
Gentamicin	Sigma, Taufkirchen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Sigma, Steinheim
Hams F12 Nutrient Mixture	Gibco (Life Technologies), Paisley, GB
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Hefe-tRNA (Ribonucleic acid, transfer from baker's yeast <i>S. cerevisiae</i> , 10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
HEPES	Roth, Karlsruhe
Immersionsöl für die Mikroskopie	Leica, Wetzlar
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck, Darmstadt
Kalium-Natrium-Tartrat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$)	Merck, Darmstadt
Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Lachssperma-DNA (Deoxyribonucleic acid, single stranded from salmon testes, 9-11 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim

L-Glutamin (200mM)	PAN Biotech, Aidenbach
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
NBT-BCIP	KPL, Gaithersburg, MD, USA
Opti-MEM I Reduced Serum medium	Gibco (Life Technologies), Paisley, GB
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
PBS-Tabletten	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin (10000 I. E./ml / 10 mg/ml)	PAN Biotech, Aidenbach
Poly-L-Lysin hydrobromid	Sigma, Steinheim
Ponceau S Solution	Sigma, Steinheim
ProLong Gold Antifade	Invitrogen, Karlsruhe
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma, Taufkirchen
RNA-later	Ambion, Austin, USA
RNase away	Molecular Bio Products, San Diego, USA
Rotiszint 22 eco Szintillatoröl	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
SOC-Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
Sodiumdodecylsulfat, SDS	Sigma, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Stickstoff, flüssig	Messer, Griesheim
TEMED, N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Serva, Heidelberg
Triethanolamin	Sigma, Steinheim
Trinatriumcitrat-Dihydrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Roth, Karlsruhe
Tri Reagent	Sigma, Steinheim
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Fluka, Seelze
Trypsin	Gibco, Karlsruhe
Tryptone/Peptone	Roth, Karlsruhe
Tween 20, Polyoxyethylensorbitanmonolaurat	Roth, Karlsruhe
Wasser für die Molekularbiologie	Roth, Karlsruhe
X-Gal, 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid	Fermentas, St. Leon-Rot

2.14 Verwendete Geräte

7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Autoklav Sanoclav	Wolf, Geislingen
Autoklav Systec 3150 EL	Systec, Wettenberg
Benchmark Microplate Reader	Bio-Rad, München
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank	Heraeus, Hanau
CO ₂ -Inkubator Nuair US AutoFlow	Integra Biosciences, Zitters, CH

CO₂-Inkubator

Divac 2.4L Vakuumpumpe

Einbettautomaten EG1160

Electrophoresis Power Supply EPS600

Elektrophorese-Kammer 14,5 cm x 6,5 cm

Elektrophorese-Kammer 35,5 cm x 11,0 cm

Fluoreszenz Mikroskop DM5500B mit

Software LAS AF 6000 mit 3D Deconvolution für

S/W-Kamera DFC340FX sowie

Filter A4 UV (Ex: BP 360/40, BS: 400, Em: BP 470/40)

Filter L5 (Ex: BP 480/40, BS: 505, Em: BP 527/30)

Filter Y3 (Ex: BP 545/30, BS: 565, Em: 610/75)

Objektiv N PLAN 5x/0.12

Objektiv HCX PL FL 10x/0.25 PH1

Objektiv HC PLAN APO 20x/0.70

Objektiv HCX PL APO 40x/0.85 CORR, 0,11-0,23

Software LAS V3.8 für Farbkamera DFC320

Flüssigkeitsszintillationszähler Wallac 1409

Gefriermikrotom HM-500-0

Gelschlitten 12 cm x 18 cm und 7,5 cm x 5,0 cm

HI 221 Calibration Check Microprocessor pH Meter

Homogenisator Ultraturrax T25

Image Master

Sterilwerkbank, Clean Air, Typ DLF-REL 6

Sterilwerkbank, DanLAF VFR 1806

Sterilwerkbank, NU-437-500-E

Magnetrührer IKAMAG RCT

Mikroskop Fluovort

Mikroskop M3Z

Neubauer Zählkammer

Operationsbesteck

PerfectBlue Semi Dry-Blotter Sedec M 20 cm x 20 cm

PerfectBlue Doppelgelsystem Twin L, 20 cm x 20 cm

PerfectBlue Doppelgelsystem Twin S, 10 cm x 10 cm

Pipetten (2, 10, 20, 100, 200, 1000, 5000 µl)

Pipettierhilfe Pipettboy Acu

Potter-Elvehjem PTFE Homogenisator 8 ml

Rotationsmikrotom RM 2123 RT

Spannungsgeber (0-200 mA, 1 kV, 150 W)

Spannungsgeber EPS 3500

StreckwasserbadTFB 45

Taumler Heidolph Polymax 1040

Thermocycler PeqStar 2x Gradient

Thermocycler Primus 96 advanced gradient

Thermomixer comfort

UV-Transilluminator

Vortex VF 2

New Brunswick Scientific,

Edison, USA

Leybold, Köln

Leica, Wetzlar

Pharmacia Biotech,

Buckinghamshire, GB

Werkstatt MZI, Gießen

Werkstatt MZI, Gießen

Leica, Wetzlar

Pharmacia, Freiburg

Microm, Walldorf

Werkstatt MZI, Gießen

Hanna Instruments, Kehl am Rhein

IKA, Staufen

Amersham Pharmacia Biotech,

Buckinghamshire, GB

Heraeus, Hanau

Claus Damm, Fredensborg, DK

Nuaire, Plymouth, USA

IKA, Staufen

Leica, Wetzlar

Wild, Heerbrugg

Roth, Karlsruhe

diverse

PeqLab, Erlangen

PeqLab, Erlangen

PeqLab, Erlangen

Gilson, Middleton, USA, oder

Sartorius (Biohit), Rosbach

Integra Biosciences, Zitters, CH

Sigma, Steinheim

Leica, Wetzlar

Werkstatt MZI, Gießen

Pharmacia Biotech, Uppsala, SE

Medite Medizintechnik, Burgdorf

Heidolph, Schwabach

PeqLab, Erlangen

PeqLab, Erlangen

Eppendorf, Hamburg

Bachofer, Reutlingen

Janke und Kunkel, Staufen

Vortexer MS3
Waage AE 240 Delta Range
Waage C-30 Microbalance
Waage Precisa 3000C-6000D
Wärmeplatte
Wärmeplatte
Wasserbad
Wasserbad SW21
Zentrifugen:
Kühlzentrifuge 5471 R
Tischzentrifuge 5415D

Ika, Staufen
Mettler-Toledo, Gießen
Cahn Instruments, Cerritos, USA
DAK-Oerlikon, Zürich, CH
LKB, Bromma, SE
Werkstatt MZI, Gießen
Memmert, Schwalbach
Julabo, Seelbach

Eppendorf, Hamburg
Eppendorf, Hamburg

2.15 Bioinformatische Programme

Programme für die Vorhersage der Sortierung von Proteinen

CELLO
<http://cello.life.nctu.edu.tw>

(Yu et al. 2006)

Euk-mPLOC 2.0
www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/euk-multi-2/

(Chou et al. 2010)

Y-LOC
<http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/YLoc/webloc.cgi>

(Briesemeister et al. 2010a; 2010b)

Target Signal Predictor
http://www.peroxisomedb.org/Target_signal.php

PSORTII
<http://psort.hgc.jp/>

(Nakai et al. 1992)

MultiLoc
<http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc>

(Hoglund et al. 2006)

Programme für die Signal-Peptidvorhersage

SignalP 4.0
www.cbs.dtu.dk/services/SignalP

(Petersen et al. 2011)

PrediSi
www.predisi.de

(Hiller et al. 2004)

TargetP 1.1
www.cbs.dtu.dk/services/TargetP

(Nielsen et al. 1997;
Emanuelsson et al. 2007)

Programme für die Sequenzauswertung

BLAST „protein blast“, NCBI
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

(Altschul et al. 1990)

DNAStar Version 8.0.2 (MegAlign, EditSeq)

Lasergene, Madison, USA

Oligo 4.0

Wojciech Rychlik, Oslo, NO

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können spezifische DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Dabei werden zum gewünschten DNA-Abschnitt komplementäre Primer angelagert, von denen aus eine DNA-abhängige DNA-Polymerase einen komplementären DNA-Strang aus im Puffer vorhandenen dNTPs synthetisiert. PCR-Reaktionen wurden zur Amplifikation von DNA-Abschnitten für die Klonierung verwendet (siehe 3.1.5). Hierfür wurde die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) mit „Proof Reading“-Funktion (5'→3'-Exo-nucleaseaktivität) für eine geringere Fehlerquote gemäß Herstelleranleitung eingesetzt. Zur Kontrolle der Genexpression und für die Genotypisierung der *Slc10a5*-Knockout-Maus (siehe 3.8.3) diente eine Taq-Polymerase (Taq DNA Polymerase (recombinant), Fermentas).

Auswahl der Primer

Die Primer wurden mit dem Computerprogramm Oligo 4.0 ausgewählt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Primer eine Länge von 20 bis 25 bp aufwiesen, am 3'-Ende ein G oder C trugen, der GC-Gehalt zwischen 50 und 60 % und die Schmelztemperatur T_m im Bereich von 55 bis 65 °C lag. Primer mit möglichst geringen komplementären Abschnitten zu sich selbst oder dem Partnerprimer wurden bevorzugt, um die Bildung von stabilen Dimeren und Loops zu verhindern. Die Primer wurden entweder von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) oder Metabion (Martinsried) synthetisiert.

3.1.2 Real-Time-PCR

Zur Bestimmung der Genexpression von Zelllinien und Geweben wurde die quantitative Real-Time-PCR benutzt. Beim Applied Biosystems 7300 Real-Time-PCR-System und der Verwendung von *Gene Expression Assays* wird folgendes Prinzip angewendet: Die verwendeten Assays enthalten zwei genspezifische Primer wie in einer konventionellen PCR, durch die es zu einer Vervielfältigung des umspannten DNA-Abschnitts kommt. Zusätzlich ist eine kurze DNA-Sonde enthalten, die am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fam und am 3'-Ende mit einem nicht-fluoreszierenden Quencher markiert ist. Solange sich der Fluoreszenzfarbstoff und der Quencher durch die Sonde verbunden in räumlicher Nähe zueinander befinden, wird die Anregungsenergie auf den Quencher übertragen und die Fluoreszenz unterdrückt. Sowohl Primer als auch Sonde binden an den komplementären DNA-Strang der Probe. Bei der Elongation vom angelagerten Primer ausgehend, baut die DNA-Polymerase durch ihre

5'→3'-Exonuklease-Funktion die Sondennukleotide ab. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff Fam vom Quencher getrennt und emittiert nach Anregung eine rote Fluoreszenz, die vom Real-Time-PCR-Gerät gemessen werden kann. Die Stärke des Fluoreszenzsignals steigt dabei proportional mit der Vervielfältigung der DNA an. Wird die Fluoreszenz als Funktion zur Zyklenzahl grafisch dargestellt, steigt nach einer gewissen Latenzphase die Fluoreszenz exponentiell an (Verdopplung der Fluoreszenz je Zyklus) bis zu einer Plateauphase, in der kein weiterer Fluoreszenzzuwachs detektiert werden kann. Im exponentiellen Abschnitt des Graphen wird ein definiertes Fluoreszenzlevel festgelegt und die Zyklenzahl bestimmt, bei der dieses Level erreicht wird. Diese Zyklenzahl wird als *Signal Threshold Cycle* (C_T) bezeichnet und ist umgekehrt proportional zur Expression des Gens.

Bei der Methode der relativen Quantifizierung wird der C_T -Wert des Zielgenes auf den C_T -Wert eines endogenen Kontrollgens bezogen. Diese relative Expression wird dargestellt durch:

$$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ endogenes Kontrollgen}$$

Die ΔC_T -Werte lassen sich schlecht direkt miteinander vergleichen, sodass sie vor ihrer Darstellung meist transformiert werden. Die einfachste Transformation ist die Berechnung des $2^{-\Delta C_T}$ -Wertes. Hierdurch werden die ΔC_T -Werte linearisiert und können leicht untereinander verglichen werden. Sollen die Werte mit einem Kalibrator (am niedrigsten exprimiertes Gen oder Organ mit der niedrigsten Expression) verglichen werden, kann der $\Delta\Delta C_T$ Wert bestimmt werden, indem der ΔC_T -Wert des Kalibrators vom ΔC_T -Wert des Zielgens abgezogen wird. Nach einer Transformation durch $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ergibt sich die relative Expression des Zielgens als die x-fache Expression des Kalibrators.

Die Bestimmung der relativen Expression wurde im 96-Well-Format auf dem Abi Prism 7300 durchgeführt. Die synthetisierte cDNA wurde 1 : 5 verdünnt und folgendem Reaktionsansatz zugegeben:

TaqMan Gene Expression Master Mix	12,5 µl
ddH ₂ O	6,25 µl
TaqMan Gene Expression Assay	1,25 µl
cDNA	5 µl

Im TaqMan Gene Expression Mastermix sind bereits Puffersubstanzen, MgCl₂, dNTPs, die DNA-Polymerase und der Fluoreszenzfarbstoff ROX als interner Standard enthalten. Die TaqMan Gene Expression Assays enthalten die Primer und die Sonde als 20-faches Konzentrat.

Die 96-Well-Platte wurde nach dem Verschließen mit einer Klebefolie gevortext, kurz anzen-
trifugiert und die PCR im ABIPrism7300 nach folgendem Schema durchgeführt:

Denaturierung	10 min	95 °C	} 40x
Denaturierung	15 s	95 °C	
Primer-Anlagerung/Fluoreszenzdetektion	1 min	60 °C	

Die Auswertung der relativen Quantifizierung erfolgte wie oben beschrieben und wurde teil-
weise mit der 7300 System SDS RQ *Study Software* (Applied Biosystems) durchgeführt.

3.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt
und können nach deren Anfärbung durch einen interkalierenden Farbstoff beurteilt oder für
weitere Schritte aus dem Gel extrahiert werden. Die Elektrophorese wurde in 0,9%igen
(>1.000 bp) bis 2%igen (<500 bp) Agarosegelen durchgeführt. Hierfür wurden 0,9 bis 2 g
Agarose pro 100 ml 1x TAE-Puffer eingesetzt, durch Aufkochen gelöst, und nach leichtem
Abkühlen wurde das Gel im Gelschlitten gegossen. Das erhärtete Gel wurde in die mit 1x
TAE-Puffer befüllte Gelkammer eingesetzt, und die Proben wurden mit 6x Ladepuffer ver-
setzt aufgetragen. Als Größenstandard wurde der *Gene Ruler DNA Ladder Mix* (Fermentas)
aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte mit 5 bis 10 V/cm, bis die Bromphenolfront zwei
Drittel bis drei Viertel des Gels durchlaufen hatte. Danach wurden die Gele für 5 bis 20 min
in Ethidiumbromid (1 µg/µl) gefärbt und für die gleiche Zeit gewässert oder in GelRed-
Lösung (Biotium) inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mit dem Geldokumentationssystem
Image Master.

3.1.4 Gel-Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem *HiYield PCR Clean-up/Gel
Extraction Kit* (SLG). Hierfür wurde das 0,9%ige Gel nach fünfminütiger Färbung auf den
UV-Transilluminator gelegt, und es wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht. Die ge-
wünschte Bande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 2-ml-Reaktionsgefäß
überführt. Nach Zugabe von 500 µl DF-Puffer erfolgte die Auflösung der Agarose für 15 min
bei 60 °C im Wasserbad. 800 µl wurden auf ein Bindsäulchen des Kits übertragen und für
30 s zentrifugiert. Es folgte ein Waschschriff mit 400 µl W1-Puffer und 600 µl Waschpuffer,
der nach 1 min Inkubation ebenfalls 30 s abzentrifugiert wurde. Das Trocknen des Filters er-
folgte durch 30 s Zentrifugation. Anschließend wurden 40 µl Elutionspuffer dazugegeben,

2 min inkubiert und 2 min in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß durch Zentrifugation eluiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 16.100 g ausgeführt.

3.1.5 DNA-Klonierung

3.1.5.1 TA-DNA-Klonierung

Bei der TA-Klonierung verwendet man einen linearisierten Vektor, an dessen Enden sich 3'T-Überhänge befinden. Inkubiert man diesen zusammen mit einer DNA-Ligase und mit einem PCR-Produkt, welches A-Überhänge aufweist, findet eine Ligation zwischen den Überhängen statt.

Zur Erzeugung der A-Überhänge wurden 10 µl gelaufgereinigtes PCR-Produkt mit 11,5 µl ddH₂O verdünnt und mit 0,5 µl 10-mM-dATPs, 2,5 µl 15-mM-Puffer und der DNA-Polymerase Dynazyme II (Finnzymes) 20 min bei 72 °C im Wasserbad inkubiert.

Für die Ligationsreaktion wurden 2 µl aus diesem Ansatz mit 1 µl ddH₂O, 5 µl *Rapid Ligation Buffer*, 1 µl T4 Ligase und dem *pGEMT (Easy) Vector* (Promega) vermischt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

3.1.5.2 Transformation

Um die *E. coli* TOP10 Bakterienzellen zu transformieren, wurden die 50 µl Zellsuspension in ihrem Schraubdeckelgefäß für 5 min auf Eis angetaut und dann mit 2 µl Ligationsansatz versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock für 45 s bei 42 °C im Wasserbad gefolgt von 2 min Abkühlen auf Eis. Dann wurden 250 µl SOC-Medium dazugegeben, und die Suspension wurde für 1 h bei 37 °C mit 220 rpm im Inkubator geschüttelt. LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin wurden mit 20 µl 50 mg/ml XGal und 100 µl 100mM IPTG pro Platte vorbehandelt und auf 37 °C vorgewärmt. Jeweils 50 µl oder 150 µl Transformationsansatz wurden darauf ausplattiert und die Platten bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert.

Da der Vektor ein Ampicillinresistenzgen trägt, können Bakterien, die erfolgreich transformiert wurden, auf den Ampicillin-haltigen Agarplatten wachsen. Gleichzeitig trägt der Vektor die codierende Sequenz der β-Galaktosidase, welche durch den Einbau des PCR-Produkts unterbrochen wird. Bakterienkolonien, die den Leervektor tragen, können also mithilfe der β-Galaktosidase XGal zu einem blauen Farbstoff (5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-indigo) umwandeln. Wurde jedoch ein PCR-Produkt in den Vektor ligiert, erscheinen die Kolonien weiß (sogenanntes *Blue-White-Screening*). Es wurden mehrere weiße Kolonien in Übernachtskulturen in LB-Medium mit Ampicillin (1 µg/ml) für eine Mini-DNA-Präparation angesetzt.

3.1.6 Mini-Präparation von Plasmiden

Die Plasmidpräparation im Minimaßstab dient dazu, die in den Bakterienzellen vermehrten Plasmide zu isolieren und aufzureinigen. Hierfür wurde das *QiaPrepSpin Mini Prep Kit* (Qiagen) verwendet, bei dem die Bakterienzellwände zunächst durch eine alkalische Lyse aufgeschlossen werden und anschließend die Plasmid-DNA an eine Silikamembran gebunden wird. Die Minipräparation wurde streng nach Protokoll durchgeführt. 2 ml Bakteriensuspension wurden in einem 2-ml-Reaktionsgefäß bei 7.500 g 3 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 250 µl P1+RNase resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl P2 und sofortigem sechsmaligen Invertieren, folgte die Neutralisation mit 350 µl N3 auch unter sechsmaligem Invertieren. Zelldetritus wurde bei 15.700 g für 10 min abzentrifugiert und der Überstand auf ein Säulchen gegeben und bei voller Geschwindigkeit (16.100 g) 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Analog hierzu erfolgte das Waschen der im Säulchen befindlichen Silikamembran jeweils durch Zugabe von 500 µl PB und dann 750 µl PE. Das leere Säulchen wurde für 1 min trocken zentrifugiert und die Plasmid-DNA mit 50 µl EB oder ddH₂O in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß durch Zentrifugation eluiert und bei –20°C gelagert.

3.1.7 Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde photometrisch mit dem BioPhotometer (Eppendorf) bestimmt. Hierzu wurde die zu messende Probe mit ddH₂O oder 10 mM Tris-Lösung verdünnt und die optische Dichte bei 260 nm gemessen. Die Konzentration wurde daraus nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{\text{OD}_{260} * E * \text{Verdünnungsfaktor}}{1000 \mu\text{l}}$$

E = Extinktionskoeffizient, E_{DNA} = 50 µg, E_{RNA} = 40 µg

Die Reinheit der Nukleinsäuren kann über den Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ bestimmt werden. Für reine DNA liegt er bei 1,8 und für RNA bei 2,0.

3.1.8 Sequenzierung

Zur Sequenzierung von Plasmiden wurden 1 bis 3 µg Plasmid-DNA auf 30 µl Gesamtvolumen verdünnt und in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß an GATC Biotech, Konstanz versendet. Sequenzierprimer in einer Konzentration von 10 pmol/µl wurden mitgeschickt oder aus den bei GATC vorrätigen Primern ausgesucht. Die Ergebnisse wurden elektronisch im FASTA-Format und als Chromatogramme bezogen und mit den Programmen DNA-Star und FinchTV ausgewertet.

3.1.9 Isolation von totaler RNA

Die Isolation von totaler RNA aus Zellen und Gewebe wurde mit TRI-Reagent durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine einphasige Lösung, die Phenol und Guanidinthiocyanat enthält und nach Zugabe von Chloroform drei Phasen ausbildet. So lassen sich aus einer Probe RNA, DNA und Proteine isolieren.

Zum Isolieren von RNA aus Zellen wurden fünf Millionen Zellen ausgezählt, bei 960 g für 5 min pelletiert und danach in 1 ml TRI-Reagent durch auf- und abpipettieren lysiert. Zum Isolieren von RNA aus Gewebe wurden 50 bis 200 µg Gewebe in 2 ml TRI-Reagent mit dem Rotor-Stator Ultraturrax in einem 15-ml-Reaktionsgefäß homogenisiert und in ein 2-ml-Reaktionsgefäß umgefüllt. Bei beiden Protokollen wurden unlösliche Bestandteile bei 12.000 g für 10 min bei 4 °C herunterzentrifugiert und je 1 ml Überstand in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Zelllysate wurden für 5 min stehen gelassen, um Nukleo-Proteinkomplexe dissoziieren zu lassen. Nun wurde 0,2 ml Chloroform dazugegeben, 15 s geschüttelt, und die Proben wurden für 10 min (Zellen) oder 4 min (Gewebe) stehen gelassen. Zur Phasentrennung erfolgte die Zentrifugation bei 12.000 g für 15 min bei genau 4 °C. Die obere klare wässrige Phase enthält die RNA. Diese wurde in ein neues RNase-freies 2-ml-Reaktionsgefäß überführt. Die in der mittleren weißen Schicht enthaltene DNA wurde verworfen und die unterste organische Phase bei –80°C eingefroren zur späteren Proteinisolation. In die wässrige Phase wurden 0,5 ml Isopropanol je 1 ml TRI-Reagent dazupipettiert, kräftig geschüttelt und 10 min stehen gelassen. Der folgende Zentrifugationsschritt bei 12.000 g für 10 min bei 4 °C pelletiert die gefällte RNA. Das Pellet wurde dann mit 2 ml 75%igem Ethanol gewaschen, das Ethanol abgezogen und das Pellet luftgetrocknet und in DEPC-Wasser (10 bis 50 µl je nach Größe) gelöst. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 3.1.7.).

3.1.9.1 Aufreinigung der RNA und DNase-Verdau

RNA, die für Applikationen wie die Arrayanalyse oder die c-DNA-Synthese mit anschließender Real-Time-PCR eingesetzt werden soll, muss besonders rein und frei von Verunreinigungen wie Phenol oder DNA sein. Besonders bei Genen, die wie *SLC10A5* nur ein codierendes Exon enthalten, kann genomische DNA sonst zu falsch positiven Ergebnissen führen, da die Real-Time-PCR-Sonden nicht über die Exon-Grenzen gesetzt werden können. Um dies zu gewährleisten, wurde ein säulchenbasiertes Aufreinigungssystem (*RNeasy Mini Kit*, Qiagen) verwendet.

Zunächst erfolgte die DNase-Digestion mit DNase I aus dem *RNase-Free DNase Set* (Qiagen), bei dem 1500 Kunitz Units in 550 µl RNase freiem Wasser gelöst wurden. Dazu wurden ungefähr 50 µg RNA in 87,5 µl Volumen mit 10 µl RDD Puffer und 2,5 µl RNase Lösung vermischt und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert.

Zu diesem Ansatz wurden 350 µl RLT-Puffer (mit 1 % β -Mercaptoethanol) und 250 µl 100%iger Ethanol gegeben, gemischt und sofort auf die Säulchen gegeben und mit 11.500 g zentrifugiert. Die Säulchen wurden darauf zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen (11.500 g) und danach für 2 min trocken zentrifugiert. Das Sammelröhrchen wurde gegen ein neues getauscht und noch einmal 1 min zentrifugiert und einige Minuten offen stehen gelassen, um sämtliche Pufferreste zu entfernen.

Die reine RNA wurde mit 2 x 20 µl RNase-freiem Wasser (2 min lösen lassen, 1 min zentrifugieren mit 11.500 g) eluiert. Die Konzentration und Reinheit wurden photometrisch bestimmt, und die RNA wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.1.9.2 Qualitätskontrolle der RNA

Die Qualität der RNA wurde mit dem Bioanalyzer (Agilent), einem Kapillarelektrophoresegerät, unter Verwendung des RNA 6000 Kits bestimmt. Wie bei einem klassischen RNA-Gel kann das Bandenmuster der RNA als Gelbild dargestellt werden oder die RNA mit den zwei typischen Peaks der 18S- und 28S-RNA als Chromatogramm gezeigt werden. So lässt sich erkennen, ob die RNA intakt oder degradiert vorliegt. Zusätzlich wird über den RIN-Wert (RNA Integritätsnummer), eine nach einem bestimmten Algorithmus automatisch berechnete Kennzahl, ein vergleichbarer Wert für die Integrität der RNA geliefert (Schroeder et al. 2006). Die Analyse wurde strikt nach Herstellerangaben durchgeführt. Zunächst wurden dazu 65 µl-Gelalliquots durch Zentrifugation der RNA-Gel-Matrix durch ein mitgeliefertes Filterröhrchen bei 1.500 g für 10 min hergestellt. Diese wurden mit 1 µl auf Raumtemperatur erwärmtem RNA-dye-Konzentrat vermischt. Der Chip wurde dann durch inverses Pipettieren blasenfrei mit 9 µl des Gels beladen, welches durch Überdruck aus einer Spritze in der *Chip Priming Station* in die Kapillaren des Chips gepresst wird. Weitere zwei Wells wurden mit 9 µl Gel befüllt. In die Wells für die Proben und die RNA-Leiter wurden danach je 5 µl RNA Marker gefüllt und dann 1 µl RNA-Leiter oder RNA dazu gegeben. Die RNA wurde vorher auf unter 0,5 µg/µl verdünnt und bei 70°C für 2 min hitzedenaturiert. Nach Vortexen für 1 min bei 2.400 rpm auf dem IKA MS3 Vortexer erfolgte direkt die Analyse auf dem Bioanalyzer mit der Agilent 2100 *Expert Software* und dem Programm „Eukaryote Total RNA Na-

no“. Die RNA wurde danach nach dem RIN-Wert klassifiziert und in gut (über 8), mittel (6 bis 8) und schlecht (unter 6) eingeteilt (Abb. 3.1).

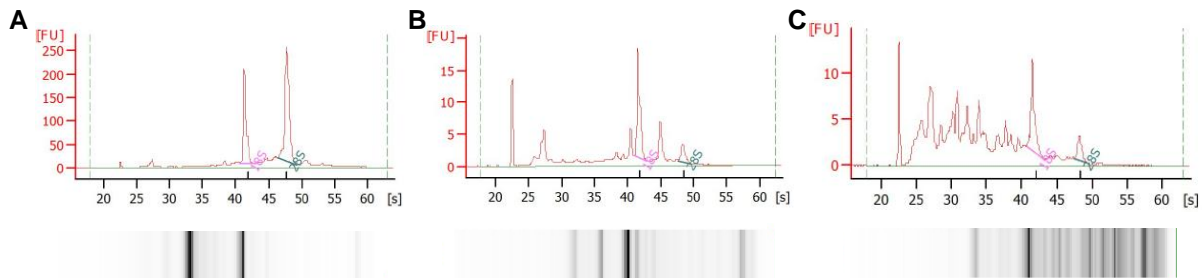


Abb. 3.1 Qualitätsüberprüfung der RNA

Die RNA wird ihrer Größe nach durch die Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Die Ergebnisse werden im Elektropherogramm als Fluoreszenzeinheit gegen die Zeit aufgetragen oder in ein Gelbild umgewandelt. Beispielhaft sind aufgetragen eine RNA guter Qualität mit RIN 9,4 (A), eine mittlere mit RIN 7,0 (B) und eine schlechte mit RIN 5,5 (C).

3.1.10 cDNA-Synthese

Die hergestellte RNA wurde mithilfe des SuperScriptIII *First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben, welche dann in klassische PCR- oder Real-Time-PCR-Reaktionen eingesetzt wurde. Die Verwendung unspezifischer *Random Hexamer Primer* erlaubt es, ungerichtet die totale RNA in cDNA zu kopieren, sodass der Gehalt der cDNA-Transkripte dem der Ausgangs-RNA entspricht.

Die RNA-Konzentration wurde vor dem Umschreiben auf 1 µg RNA in 8 µl ddH₂O eingestellt. Dazu wurden 1 µl Random Hexamer Primer und 1 µl 10mM dNTP-Mix gegeben und für 5 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Abschrecken auf Eis erfolgte die Zugabe von 2 µl 10x RT-Puffer, 4 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNase Out und 1 µl SuperScript III Reverse Transkriptase (200 I. E./µl). Im Wasserbad wurde daraufhin für 10 min bei 25 °C, 50 min bei 50 °C und 5 min bei 85 °C inkubiert. Nicht umgeschriebene RNA-Reste wurden durch einen Verdau mit 1 µl RNase H für 20 min bei 37 °C abgebaut.

3.2 Genexpressionsanalyse mittels genomweiter Array-Analyse

Um die Genexpression der *Slc10a5*-Knockout-Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus und Genregulationen durch die Fütterung mit 0,5 % Cholsäure zu untersuchen, wurde mit der Leber-RNA eine Arrayanalyse durchgeführt. Die Arrayanalyse wurde von Herrn Dr. Dittrich-Breiholz in der Zentralen Forschungseinrichtung „Transcriptomics“ der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Die isolierte und aufgereinigte RNA wurde dort zunächst auf

dem Bioanalyzer (Agilent) auf ausreichende Qualität geprüft. *Das SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray Kit* (Agilent Technologies) wurde für die Analyse verwendet. Mit diesem Microarray werden 39.430 Entrez Gene RNAs sowie 16.251 lincRNAs bestimmt. Somit können Aussagen über alle bekannten Gene sowie nicht charakterisierte RNA-Abschnitte gemacht werden. Die Synthese der Cy3-markierten cRNA wurde mit dem *Quick Amp Labeling kit one color* (Agilent Technologies) nach Herstellerangaben durchgeführt. Auch cRNA-Fragmentierung, Hybridisierung sowie die Waschschrte erfolgten streng nach dem Herstellerprotokoll. Es wurde nach dem *One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol V5.7* verfahren, mit der Modifikation, dass 1000 ng von jeder cRNA für die Hybridisierung verwendet wurde. Die Microarray-Slides wurden auf einem Agilent Micro Array Scanner G2565CA (Pixel Auflösung 3 µm, Bit-Tiefe 20) gescannt. Die Datenextraktion mit der Feature Extraction Software V10.7.3.1 wurde unter Verwendung des „extraction protocol file: GE1_107_Sep09.xml“ durchgeführt.

Die prozessierten Intensitätswerte des Grünkanals („gProcessedSignal“ oder „gPS“) wurden durch *global linear scaling* normalisiert. Dabei wurden alle gPS-Werte einer Probe mit einem Array-spezifischen Skalierungsfaktor multipliziert. Der Skalierungsfaktor wurde berechnet, indem ein Referenz-75.-Perzentil-Wert (für alle auf 1.500 gesetzt) durch den 75.-Perzentil Wert des Microarrays (Array_i) geteilt wurde:

$$\text{normalisiertes gPS}_{\text{Array } i} = \text{gPS}_{\text{Array } i} \times (1.500 / 75\text{-Perzentil}_{\text{Array } i})$$

Ein unterer Intensitätsschwellenwert wurde definiert als 1 % des Referenz 75.-Perzentil-Wert (= 15). Alle normalisierten gPS-Werte, die niedriger als diese Intensitätsgrenze lagen, wurden mit dem Surrogatwert 15 ersetzt. Das bedeutet, dass wenn keine Expression eines bestimmten Gens vorliegt, wird nicht der Wert 0 angegeben, sondern 15. Berechnungen zu relativen Genexpressionen zwischen den Proben wurden über Excelmakros durchgeführt. Die erhaltenen normalisierten Fluoreszenzwerte sind linear verteilt und konnten so auch direkt miteinander verglichen und mit dem Programm Graph Pad Prism 5 dargestellt und statistisch ausgewertet werden.

3.3 Zellkultur

Die verwendeten HEK293- und HepG2-Zelllinien wurden nach Regeln des sterilen Arbeitens im Zellkulturlabor kultiviert. Ihre Anzucht erfolgte bei 37 °C, 95 % Wasserdampfsättigung und 5 % CO₂ im Brutschrank. Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank mit sterilem oder desinfiziertem Gerät durchgeführt.

Je nach Bedarf wurden die Zellen bei 90 % iger Konfluenz gesplittet. Dafür wurden die in 75-cm²-Schalen wachsenden Zellen zunächst mit 10 ml PBS gewaschen, dann mit 1 ml Trypsinlösung versetzt und bei 37 °C inkubiert, bis die Zellen begannen sich abzulösen, was durch Anschlagen der Zellschale beschleunigt wurde. Die Reaktion wurde mit 2 ml Medium abgestoppt, und es wurden durch Hoch- und Herunterpipettieren Zellaggregationen vereinzelt. Dann wurden die Zellen entweder 1 : 10 verdünnt in neue Kulturschalen überführt und auf 10 ml Volumen mit Medium aufgefüllt oder in der Neubauer-Zählkammer nach Trypanblaufärbung ausgezählt und je nach geplantem Versuch in 6- oder 24-Well Zellkulturplatten ausgesät.

3.3.1 Einfrieren und Auftauen

Zum Einfrieren der Zellen wurden 900 µl Zellsuspension nach dem Abtrypsinieren mit 100 µl DMSO als Frostschutzmittel in einem Cryovial vermengt und in einer Styroporbox für 24 h bei –80 °C heruntergekühlt und dann in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Cryovials bei 37 °C im Wasserbad erwärmt, die Zellsuspension wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 300 g für 3 min pelletiert und das DMSO-haltige Medium abgesaugt. Die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und in eine 25-cm²-Zellkulturschale überführt und auf 5 ml Gesamtmedium aufgefüllt.

3.3.2 Transfektion

Um die Lokalisation und die Funktion von Proteinen im Zellkulturmodell untersuchen zu können, werden diese in Zellen exprimiert. Hierzu wird ein Expressionsplasmid, welches eine Promotorsequenz und die codierende Sequenz des Zielgens beinhaltet, in die Zelle eingebracht, in welcher das Gen abgelesen und in ein Protein translatiert werden kann. Wird das Plasmid nur kurzfristig in die Zelle eingebracht, spricht man von transienter Transfektion. Bei der stabilen Transfektion hingegen wird das Konstrukt in das Genom der Zelle integriert und kann so an die Tochtergenerationen weitergegeben werden.

Transiente Transfektion

Die transienten Transfektionen wurden mithilfe der Lipofektion durchgeführt, bei der die Plasmid-DNA in Liposomen eingeschlossen wird, welche von den Zellen aufgenommen werden. Hierzu wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000 (Invitrogen) verwendet.

Die Zellen wurden auf Poly-L-Lysin (HEK293-Zellen) oder Kollagen (HepG2-Zellen) beschichteten 24-Well-Zellkulturplatten mit oder ohne Glasdeckgläschen ausgesät und 24 h spä-

ter bei 60 bis 70 % Konfluenz transfiziert. Hierzu wurde das Zellkulturmedium durch 0,5 ml/Well Antibiotika-freies Zellkulturmedium ersetzt. Die Plasmid-DNA und das Transfektionsreagenz wurden zunächst getrennt in Opti-MEM I verdünnt und nach 5 min zusammengeführt. Nach 30 min, in denen sich die Liposomen formten, wurde die Mischung tropfenweise auf die Oberfläche des Mediumspiegels gegeben und die Zellkulturplatte in horizontaler Richtung vorsichtig geschüttelt.

je Well (24-Well-Platte)	HEK293	HepG2
Plasmidmenge	1 µg	1 µg
Lipofektaminmenge	2 µl	3 µl
Opti-MEM I je Ansatz	ad 50 µl	ad 50 µl

Stabile Transfektion

Die HEK293-SLC10A5-V5-Zelllinie wurde mittels stabiler Transfektion erstellt. Hierfür wurde das Flp-In System (Invitrogen) verwendet. Die Flp-In T-REx 293 Zelllinie trägt eine stabil integrierte FRT-site (Flippase recognition target), welches die Zielsequenz für die Flp-Rekombinase darstellt. Das verwendete Expressionsplasmid pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO (Invitrogen) ist auch mit einer FRT-site sowie der Hygromycinresistenzkassette ausgestattet, hinter die der Leserahmen des humanen SLC10A5 einkloniert wurde. Bei Cotransfektion des Expressionsplasmiids mit dem Plasmid pOG44, welches für die Flp-Rekombinase codiert, kommt es zu einer homologen Rekombination am Genort der FRT-site und somit zu einem gerichteten Einbau von Selektionskassette und SLC10A5-Leserahmen. Gleichzeitig wird die Hygromycinresistenz ausgebildet.

Für die stabile Transfektion wurden die Flp-In-Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von etwa 70 % wachsen gelassen. Danach wurde je Well 1 µg des Plasmids SLC10A5-pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO mit 7 µg pOG44 gemischt und auf 50 µl Volumen mit Opti-MEM I aufgefüllt. Gleichzeitig wurde 24 µl Lipofectamine 2000 (Invitrogen) mit 26 µl Opti-MEM I gemischt, nach 5 min zusammengeführt und nach 20 min Inkubationszeit tropfenweise auf die Oberfläche des Mediums gegeben.

Die Zellen wurden über Nacht mit dem Transfektionsreagenz im 37 °C-Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und einen Tag später mit 500 µl Trypsin abgelöst, es wurden 1,5 ml Zellkulturmedium dazugegeben und je 1 ml davon in mit Poly-L-Lysin beschichtete Petrischalen mit 9 ml Medium überführt. Nach dem Anwachsen der Zellen erfolgte die Zugabe des Selektionsantibiotikums Hygromycin B mit einer Endkonzentration im Zellkulturmedium von 150 µg/ml, um nicht stabil transfizierte Zellen abzutöten. Nach etwa zwei Wochen konnten einzelne Zellklone gepickt werden, die in eine 24-Well-

Zellkulturplatte ausgesät wurden. Die Einzelklone wurden vermehrt und mittels Immuncyto-logie mit dem Maus-V5-Antikörper (Invitrogen) auf Stärke und Konstanz der Proteinexpres-sion überprüft. Hierbei zeigte der Klon 1a die stabilste Proteinexpression sowie gute Wachs-tumseigenschaften und wurde für alle weiteren Versuche verwendet.

Die eingesetzte Zelllinie HEK293-NTCP-Flag wurde am Institut für Pharmakologie und To-xikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen auf gleiche Weise hergestellt. Das verwendete Plasmid NTCP-FLAG-pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen) trägt zwischen dem CMV-Promotor und dem NTCP-Leserahmen zwei Tetracycline-Operator-Sites. Da die Flp-In-T-REx293-Zell-linie durch das stabil integrierte Plasmid pcDNA6/TR konstitutiv den Tetracyclin-Repressor exprimiert, der das Ablesen des NTCP verhindert, wird erst nach Zugabe von Tetracyclin die Transkription gestartet.

3.4 Proteinmethoden

3.4.1 Extraktion von Membranproteinen

Aus dem Rattengewebe wurden mit dem *Proteo Extract Native Membrane Protein Extraction Kit* (Calbiochem) Proteine isoliert. Dabei werden in einem ersten Schritt zunächst lösliche zytoplasmatische Proteine und in einem zweiten integrale Membranproteine und Membran-assoziierte Proteine isoliert.

Etwa 150 µl Gewebe wurde in kleinen Stückchen in ein 2-ml-Reaktionsgefäß eingefüllt und drei Mal gewaschen, indem 2 ml eiskalter Waschpuffer zugesetzt und für 2 min bei 100 g bei 4 °C zentrifugiert wurde. Danach wurde das Gewebe mit 2 ml Extraktionspuffer 1 und 10 µl *Protease Inhibitor Cocktail* in einem 15-ml-Potter-Elvehjem-Homogenisator mit zehn Stößen homogenisiert. Das wieder in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführte Homogenat inkubierte für 10 min bei 4 °C auf dem Drehrad. Danach erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 16.000 g und 4 °C. Der Überstand (E1), welcher die löslichen Proteine enthält, wurde abge-zogen, aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt. Das Pellet wurde in 1 ml Extraktionspuffer 2 mit 5 µl *Protease Inhibitor Cocktail* resuspendiert und 30 min bei 4 °C auf dem Drehrad in-kubiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 16.000 g bei 4 °C wurde der Überstand (E2) mit den Membranproteinen abgezogen, ebenfalls aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.4.2 Gesamtproteinextraktion

Gewebe

Die Gesamtproteine aus Gewebe wurden mit *ProteoJet Mammalian Cell Lysis Reagent* (Fer-mentas) extrahiert. Hierfür wurden circa 150 mg Gewebe mit 1 ml Lysepuffer und 5 µl *Pro-*

tease Inhibitor Cocktail im Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert und in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß bei 1.000 rpm für 10 min in einem Schüttler inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 15 min bei 16.000 g und 4°C wurde der Überstand abgezogen, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

Zellen

Um die Gesamtproteine aus Zellen zu isolieren, wurden die Zellen in 6-Well-Zellkulturschalen kultiviert. Je Well wurden 400 µl Lysepuffer aus dem *ProteoJet Mammalian Cell Lysis Reagent* (Fermentas) zugegeben und auf dem Schüttler für 10 min inkubiert. Das Lysat wurde danach in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und für 15 min bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgezogen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.4.3 Mitochondrienisolierung

Zur Isolierung von Organellen wurde in Anlehnung an ein Protokoll zur Isolation von Mitochondrien aus Lebergewebe und Fibroblasten (Frezza et al. 2007) ein einfaches Zentrifugationsprotokoll verwendet. Die Zellen oder das mit der Schere grob zerkleinerte Gewebe wurden in 1,5 ml IB_C suspendiert und im Potter-Elvehjem-PTFE-Homogenisator durch vierzig Schübe aufgebrochen. Die großen Bruchstücke (Zellmembran und Zellkerne) wurden durch zwei Zentrifugationsschritte für 10 min bei 50 g (Pellet 1) sowie 600 g (Pellet 2) pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 7.000 g für 10 min zentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde mit 200 µl IB_C gewaschen und noch einmal zentrifugiert. Alle Schritte wurden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Das Pellet (Mitochondrienfraktion) und der Überstand wurden bei -80 °C aufbewahrt.

3.4.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Um eine definierte Menge Gesamtprotein in den Western Blot einsetzen zu können, musste zunächst der Gesamtproteingehalt der Proteinlösung bestimmt werden. Hierfür fand *das BCA Protein Assay Kit* (Novagen) Verwendung. Zunächst wurde eine Standardreihe mit 0 bis 1.000 µg BSA im verwendeten Extraktionspuffer vorbereitet, um Beeinflussungen der Extinktion durch die Puffersubstanzen herauszurechnen. Von den Standards und den Proben wurden 25 µl in Dreifachbestimmung in die Wells einer 96-Well-Platte gegeben und mit jeweils 200 µl BCA-Lösung und 4 µl 4%igem Kupfersulfat gemischt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die Farbtintensität bei 570 nm im ELISA-Reader bestimmt. Hierbei diente die 0-

µg-Standardprobe als Leerwert. Aus den Werten der Standardreihe konnte eine Standardgerade ermittelt werden, anhand derer die Probenwerte errechnet wurden.

3.4.5 Western Blot

Bei dieser Methode wird zunächst eine denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt, bei der die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die Proteine werden aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, und dort werden mittels Antikörperbindung spezifische Proteine markiert, die durch eine folgende Chemielumineszenzreaktion auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden können.

Die Auftrennung erfolgte im Doppelkammersystem PeqLab PerfectBlue. Hierfür wurde zunächst ein 12%iges Polyacrylamidtrenngel gegossen, das mit Isopropanol überschichtet auspolymerisierte. Darüber wurde ein Sammelgel gegossen, in das der Gelkamm eingesetzt wurde. Nach dessen Erstarren wurde das Gel in die Pufferkammer eingesetzt und diese mit 1x Tris-Tricine-SDS-Elektrophoresis Buffer (Fermentas) gefüllt.

Es wurden zwischen 20 und 40 µg Protein je Gelslot aufgetragen. Hierfür wurde die Proteinlösung im Verhältnis 1 : 4 mit 4x-Lämmli-Puffer vermischt und entweder für 5 min auf 100 °C erhitzt oder direkt eingesetzt. Als Größenstandard wurden 5 µl des farbigen Markers *PageRuler Prestained Protein Ladder Plus* (Fermentas) und 5 µl des *RotiMark Western Marker* (Roth) verwendet.

Durch das Anlegen einer Spannung von 120 V für ungefähr 1 h liefen die Proteine in das Sammelgel ein und trennten sich unter 40 V über Nacht im Trenngel auf. Das Trenngel wurde vom Sammelgel abgelöst. Es wurden sechs Filterpapiere sowie die *Hybond ECL Nitrocellulose Membran* (GE Healthcare) auf dieselbe Größe zugeschnitten und für 10 min in Transferpuffer geschwenkt. Danach wurden zunächst drei Filterpapiere auf den *PerfectBlue Semi-Dry*-Elektroblotter (PeqLab) aufgelegt und darauf die Nitrozellulosemembran, das Gel und drei weitere Filterpapiere aufgebracht. Diese Schichten wurden durch Anrollen mit einem 50-ml-Reaktionsgefäß von überschüssigem Puffer und Luftblasen befreit. Nachdem der Deckel des Elektroblotters aufgelegt und festgezogen war, wurde an den Elektroblotter eine Spannung so angelegt, dass der Deckel die Kathode und der Boden die Anode darstellte. Die negativ geladenen Proteine wanderten somit in Richtung der Anode aus dem Gel auf die darunter liegende Nitrozellulosemembran und banden dort. Das Blotten wurde mit 3 mA/cm² Gelfläche für 1 h durchgeführt.

Die erfolgreiche Übertragung der Proteinbanden wurde durch Anfärben der Membran mit *Ponceau S Solution* (Sigma) überprüft. Nach dem Waschen der Membran in TBST wurden für 1 h in 5%iger Blockierlösung die unspezifischen Bindungsstellen abgesättigt. Danach erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers in 5%iger Blockierlösung über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler. Die Membran wurde mit TBST abgespült und dann 1x 15 min und 3x 5 min in TBST gewaschen. Der ECL-HRP-gekoppelte Sekundärantikörper sowie das ECL-Konjugat zur Detektion des RotiMark Western Marker wurden 1 : 5000 in TBST für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler dazugegeben. Es folgten wieder die Waschschritte mit TBST. Rotilumin1 und Rotilumin2 (Roth) wurden 1 : 1 gemischt und 1 ml/10 cm² Membran für 1 min auf die auf Filterpapier abgetupfte Membran gegeben. Nach Abtropfen der Membran wurde diese in eine Folie gelegt und in einer Röntgenkassette mit passend zugeschnittenem Amer-sham Hyperfilm ECL-Film (GE Healthcare) belegt, welcher zwischen 1 und 10 min belichtet wurde. Das im Rotilumin enthaltene Luminol wird von der Meerrettich-Peroxidase, die an den Sekundärantikörper gekoppelt ist, umgesetzt und emittiert daraufhin Licht, welches den Röntgenfilm belichtet. Der Röntgenfilm wurde danach in *Rodinal B&W Developer* (Agfa) entwickelt, die Reaktion mit 2%iger Essigsäure gestoppt, in Hypam Schnellfixierer (Ilford) für 2 min fixiert, anschließend gewässert und getrocknet.

3.5 Mikroskopische Verfahren

3.5.1 Antikörperbasierte Proteindetektion

Mit antikörperbasierten Verfahren können Proteine im Gewebe oder in Zellen sichtbar gemacht werden. Hierfür werden die Proben mit einem gegen ein Epitop des Zielproteins gerichteten Antikörper (Primärantikörper) markiert. Bei der indirekten Immunmarkierung wird dann ein gegen den Primärantikörper gerichteter Sekundärantikörper eingesetzt, der entweder mit einem Fluorophor oder einem Enzym, das ein Farbsubstrat umsetzt, gekoppelt ist.

3.5.2 Immunhistologische Untersuchungen

Bei der Immunhistologie werden spezifische Zielproteine in Gewebeschnitten sichtbar gemacht. Um die zelluläre Lokalisation des SLC10A5 Proteins in Menschen-, Ratten- und Mausgewebe zu untersuchen, wurde ein modifiziertes Protokoll nach dem Institut für Veterinär-anatomie, -histologie und -embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen verwendet.

Probenvorbereitung

Für die Immunhistologie wurden Paraformaldehyd-fixierte Organe verwendet. Diese wurden entweder durch Immersionsfixierung der Organe einer frischtoten Maus in 4%iger Paraformaldehydlösung über 24 h oder über eine Perfusionsfixierung der Ratte oder Maus mit anschließender Nachfixierung gewonnen.

Bei der Perfusionsfixierung wurde die Maus zunächst in eine tiefe Narkose mithilfe intraperitonealer Injektion eines Gemisches aus Xylazin (16 bis 24 mg/kg KGW) und Ketamin (100 bis 120 mg/kg KGW) versetzt. Die ausreichende Narkosetiefe wurde über den vollständigen Ausfall von Schwanz-, Zwischenzehen-, Lid- und Kornealreflex überprüft. Hatte die Maus das Toleranzstadium erreicht, wurde sie in Rückenlage fixiert und die Bauch- und die Brusthöhle in der Medianen eröffnet. Zügig wurde das Perfusionsbesteck mit aufgesetzter Spritze in die linke Herzkammer eingeführt und mit einer Pinzette fixiert. Anschließend wurde der rechte Vorhof eröffnet und gleichzeitig langsam physiologische Kochsalzlösung in die linke Herzkammer injiziert, um das Blut aus dem Gefäßsystem zu entfernen. Nach dem Spülen mit physiologischer Kochsalzlösung wurde phosphatgepufferte 4%ige Paraformaldehydlösung zur Fixierung perfundiert. Die Organe wurden zügig entnommen und für zwölf Stunden in phosphatgepufferter 4%iger Paraformaldehydlösung nachfixiert. Danach wurden sie in 70%igen Alkohol überführt.

Die Organe wurden im Einbettautomaten EG1160 (Leica) des Instituts für Veterinäranatomie, -histologie und -embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen in Paraffin eingebettet. Von Paraffinblöckchen wurden 4 bis 5 µm dicke Schnitte auf dem Rotationsmikrotom angefertigt und auf *Superfrost Plus* Objektträger aufgezogen. Im 50 °C heißen Wasserbad wurden die Schnitte gestreckt und über Nacht bei 37 °C getrocknet. Die positiv geladene Oberfläche der Objektträger führt zu einer elektrostatischen Anziehung der Schnitte und der Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen dem formaldehydfixierten Gewebeschnitt und dem Glas.

Immunhistologie

Die Objektträger wurden zunächst entparaffinisiert durch Inkubation in Xylol für 3x 7 min. Es folgte die Rehydratisierung in der absteigenden Alkoholreihe mit jeweils 3 min in 100, 96, 80, 70 und 50%igem Ethanol und doppeltdestilliertem Wasser.

Danach wurden die Schnitte hitzedemarkiert, um die durch die Fixierung vernetzten Proteinstrukturen wiederherzustellen und die Antigenität zurückzuerlangen. Hierfür wurden die Objektträger in 500 ml Citratpuffer in der Mikrowelle erhitzt und dann für 15 min auf der Heizplatte in 97 °C heißem Puffer inkubiert. Der Citratpuffer wurde im kalten Wasserbad herunter-

gekühlt, und die Objektträger wurden danach 5 min in Waschpuffer in der Küvette auf einem Schüttler gewaschen.

Zum Blockieren der endogenen Peroxidasen, die ansonsten mit dem Farbsubstrat reagieren und unspezifische Farbreaktionen auslösen können, erfolgte die Inkubation in Waschpuffer mit 30 % zugesetztem Wasserstoffperoxid für 30 min auf dem Schüttler. Nach dreimaligem Waschen in Waschpuffer für 3 min folgte die Permeabilisierung und Blockierung in Waschpuffer mit 1 g bovinem Serumalbumin je 70 ml und 1 : 20 eingesetztem Ziegen Serum. Die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper wurde auf dem Objektträger durchgeführt. Hierfür wurde der Schnitt mit einem Wachsstift eingekreist. Von dem in Blockierlösung ohne Ziegen Serum verdünnten Antikörper wurden 50 bis 100 µl auf den Schnitt aufgetragen. Sollte eine Peptidblockierung durchgeführt werden, wurde die Antikörperlösung vorher mit dem Immunisierungspeptid in 100-fach molarem Überschuss versetzt und für 1 bis 2 h bei Raumtemperatur auf dem Drehrad inkubiert. Die Reaktion mit dem Primärantikörper erfolgte in einer mit feuchten Tüchern ausgelegten Kammer bei 4 °C über Nacht.

Nach dreimaligem 5-minütigen Waschen erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden biotinylierten Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen 1 : 200 für 1 h bei Raumtemperatur. Viermaliges Waschen von je 5 min Dauer entfernte nicht gebundenen Antikörper. Die ABC-Lösung (Avidin/biotinylierte Peroxidase-Komplex) wurde 30 min vor Gebrauch mit 5 ml PBS und je 2 Tropfen Lösung A und B angesetzt. Die Schnitte wurden damit betropft, 1 h in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert und danach drei Mal 5 min gewaschen. Durch Auftropfen des Chromogens AEC (3-amino-9-ethylcarbazole), wovon kurz vor der Anwendung ein Tropfen unter 300 µl Substratpuffer gemischt wurde, bildete sich durch die Peroxidaseraktion ein roter Farbstoff. Der Fortschritt der Umsetzung des Farbstoffs wurde makroskopisch und unter dem Mikroskop überwacht und durch Spülen in destilliertem Wasser abgestoppt. Es folgten noch die Kernfärbung mit verdünntem Hämatoxin für 20 s und ein Stoppen und Waschen für jeweils 5 min in Leitungswasser und destilliertem Wasser. Danach wurden die Schnitte mit erwärmter Glycerolgelatine eingedeckelt.

Mikroskopie

Die Schnitte wurden danach unter dem Lichtmikroskop Leica DM 5500 B mit dem Programm LAS V3.8 unter Verwendung der Farbkamera DFC320 fotografiert.

3.5.3 Immunfluoreszenzuntersuchungen an Cryoschnitten

Probenvorbereitung

Organe aus frishtoten Tieren wurden für sechs Stunden in phosphatgepufferter 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert und über Nacht in 20%ige Sucroselösung überführt. Danach wurden die Organe in pulverisiertem Trockeneis schockgefroren und bei $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Schneiden

Im Institut für Veterinär-Physiologie und -Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen wurden am Gefriermikrotom (Microm HM-500-0) von den Organen 10 bis 20 μm dicke Schnitte angefertigt und auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufgezogen.

Immunfluoreszenzfärbung

Zunächst wurden die Schnitte drei Mal jeweils 5 min in Phosphatpuffer rehydriert. Dann wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit Wachsstift eingekreist und 1 h bei Raumtemperatur in Blockierlösung die unspezifischen Bindungsstellen abgesättigt und gleichzeitig durch Triton-X-100 auch permeabilisiert. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte entsprechend in Antikörperlösung über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Kontrollen ohne den Primärantikörper wurden mitgeführt. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in Phosphatpuffer konnte der korrespondierende Sekundärantikörper für 2 h bei Raumtemperatur inkubieren. Es folgten drei Waschschritte von jeweils 5 min Dauer in Phosphatpuffer und die Kernfärbung mit DAPI 1 : 1.000 für 5 min. Nach erneutem dreimaligen jeweils fünfminütigen Waschen wurden die Objekte mit *Prolong Gold Antifade* (Invitrogen) eingedeckelt.

Mikroskopie

Die Schnitte wurden mit dem Mikroskop Leica DM 5500 B und der S/W Kamera DFC340 FX und der Software LAS AF 6000 (Leica) ausgewertet.

3.5.4 Immunfluoreszenzuntersuchungen an Zellen

Zum Nachweis der erfolgten stabilen Transfektion und der Aufklärung der subzellulären Lokalisation von SLC10A5 in nativ exprimierenden und SLC10A5-transfizierten Zellen wurde die Immunfluoreszenz gewählt.

Vorbereitung der Zellen

Die Zellen wurden in 24-Well-Platten auf Poly-L-Lysin oder Collagen-beschichteten Deckgläschen ausgesät und über ein bis zwei Tage wachsen gelassen.

Immunfluoreszenzfärbung

Zunächst wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, und die Zellen wurden 5 min in PBS auf dem Schüttler gewaschen. Danach erfolgte die Fixierung mit 4%iger Paraformaldehydlösung für 15 min. Nach zwei Mal 5 min Waschen in PBS wurde die Reaktion mit glycinhaltigem Puffer A für 5 min abgestoppt, und die Zellen wurden in Puffer A + 0,2 % Triton-X-100 für 5 min permeabilisiert. Wenn nur die Zellmembran permeabilisiert werden sollte, wurden die Zellen mit Digitonin-Permeabilisierungspuffer (Digitonin 60 µg/ml) für 5 min auf Eis permeabilisiert. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, erfolgte die Inkubation mit Blockierlösung für 30 min.

Der Primärantikörper wurde in Blockierlösung verdünnt und über Nacht bei 4 °C inkubieren gelassen. Nach dreimaligem jeweils fünfminütigen Waschen mit PBS wurde der Sekundärantikörper in Blockierlösung verdünnt und für 1 bis 2 h inkubiert. Auch dieser wurde drei Mal jeweils 5 min mit PBS abgewaschen. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI 1 : 5000 in Methanol verdünnt für 5 min. Gewaschen wurde 5 min mit purem Methanol. Danach wurden die Deckgläschen luftgetrocknet und mit *Prolong Gold Antifade* (Invitrogen) eingedeckelt.

3.5.5 Hämatoxillin-Eosin-gefärbte Schnitte

Die histologischen Untersuchungen der Mausgewebe wurden in Kooperation mit Herrn Dr. Kernt Köhler am Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Das fixierte Mausgewebe wurde dort zunächst in Paraffin eingebettet, und danach wurden 4 bis 6 µm dicke Schnitte angefertigt, die schließlich mit Hämatoxilin-Eosin nach Standardmethode gefärbt wurden. Die Fotografie der Gewebeschnitte erfolgten dann am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen mit dem Lichtmikroskop Leica DM 5500 B mit dem Programm LAS V3.8 unter Verwendung der Farbkamera DFC320.

3.5.6 Fluoreszierende Gallensäuren

Der Einfluss der SLC10A5-Expression in Zellen auf die intrazelluläre Verteilung und den Transport von Gallensäuren sollte mit fluoreszierenden Gallensäuren sichtbar gemacht werden. Hierzu wurden die NBD(4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol)-gekoppelten Gallensäuren Taurocholat und Cholat verwendet.

Zunächst wurde durch einen Aufnahmeversuch in stabil NTCP exprimierende Zellen überprüft, ob die Gallensäuren noch stabil und leuchtkräftig waren. Dann wurden sowohl HEK293-Zellen als auch stabil hSLC10A5 exprimierende HEK293-Zellen in einer 24-Well-Platte mit 100.000 Zellen je Well ausgesät und zwei Tage darauf mit hNTCP-V5-His transfiziert, damit die Gallensäuren über die Plasmamembran aufgenommen werden konnten. Negativkontrollen ohne Plasmidtransfektion wurden mitgeführt. Drei Tage später wurden die Zellen in 1 μ M Cholat-NBD oder Taurocholat-NBD in Medium für 10 min inkubiert, ein Mal mit PBS gewaschen und dann wieder mit Zellkulturmedium versetzt und im CO₂-Inkubator aufbewahrt. Nach 10, 30, 60 und 120 min sowie 17 und 41 h wurde die Verteilung der Gallensäurefluoreszenz mit dem inversen Mikroskop Leica DMI 6000 B begutachtet.

3.6 *In-situ*-Hybridisierung

Bei der *In-situ*-Hybridisierung werden gegen die gesuchte RNA komplementäre Sonden benutzt, die im Gewebe (= *in situ*) die Verteilung der mRNA aufzeigen. Um die Gewebeverteilung der *Slc10a5*-RNA zu bestimmen, wurden Digoxigenin-markierte, einige hundert Basenpaare lange RNA-Sonden verwendet, weil diese Methode eine hohe Sensitivität mit Spezifität kombiniert. Es wurde auf Grundlage eines von Herrn Prof. Dr. Klaus Steeger in der Veterinär-anatomie etablierten Protokolls ein an die Sonden und das Gewebe angepasstes Protokoll erarbeitet und am Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

Sondenherstellung

Zunächst wurde ein Abschnitt des m*Slc10a5*-Gens zur Sondenherstellung ausgewählt und in den Vector pGEMT oder pGEMT Easy (Promega) kloniert. Dieses Plasmid besitzt vor dem Insert den T7- und revers den SP6-Promotor, von dem aus die RNA-Polymerase die klonierte Sequenz in RNA umsetzt. Um die Elongation hinter dem Insert zu stoppen, wird durch ein Restriktionsenzym auf der promotorabgewandten Seite geschnitten. Dabei entstehen die Sense-Sonde, die die gleiche Sequenz wie die mRNA hat und deswegen nicht bindet, und die Antisense-Sonde, die komplementär zur mRNA ist und mit dieser hybridisieren kann.

Restriktionsverdau

1 μ g Plasmid wurde im 20 μ l Ansatz mit dem entsprechenden Restriktionsenzym nach Herstellerangaben verdaut. Hierfür wurde aus der Konzentration des Plasmids die benötigte Menge in μ l berechnet, um 1 μ g in den Verdau einzusetzen. Die Plasmidlösung wurde in einem

1,5-ml-Reaktionsgefäß mit 1 µl Restriktionsenzym und 2 µl Restriktionspuffer versetzt, der Ansatz mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt und für 4 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

***In-vitro*-Transkription**

Für die *In-vitro*-Transkription wurden 1 bis 2 µl Verdau mit 4 µl 5x-Transkriptionspuffer, 2 µl 100x-DTT, 2 µl 10x-DIG-RNA-Labeling-Mix und 2 µl RNA Polymerase (SP6 oder T7) in einem RNase-freien Reaktionsgefäß gemischt und auf 20 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Das Gemisch wurde für 1 bis 2 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, dann 20 min mit DNase (1 I. E./ml) bei 37 °C das DNA-Template verdaut. Durch Zugabe von 0,5 µl 0,5 M EDTA wurde die Polymerase deaktiviert, durch 1,2 µl LiCl die RNA-Sonde von nicht eingebauten Digoxigenin-Nukleotiden gereinigt und durch 70,7 µl 96%igen Ethanol (–20 °C) die RNA über Nacht bei –80 °C gefällt. Die RNA wurde bei 18.000 g für 20 min bei 4 °C pelletiert. Im Anschluss an das Waschen mit 200 µl 70%igem Ethanol wurde das Pellet noch einmal für 15 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Alkohols trocknete das Pellet an der Luft und wurde mit 50 µl DEPC-Wasser resuspendiert.

***In-situ*-Hybridisierung**

Die Schnitte wurden wie für die Immunhistologie beschrieben angefertigt (siehe Kapitel 3.5.2). Gewebe von Wildtyp- und Knockout-Mäusen wurde nebeneinander auf den Objektträgern aufgezogen, um gleiche Bedingungen zu schaffen. Bei der *In-situ*-Hybridisierung muss auf striktes RNase-freies Arbeiten geachtet werden, um den Abbau der RNA zu verhindern. Deshalb müssen hitzesterilisierte Geräte und DEPC-behandeltes Wasser benutzt werden. Das Trocknen der Schnitte erfolgte deswegen bei 60 °C.

Das Entparaffinisieren erfolgte 5 min in Xylol bei 60 °C und zwei Mal 5 min bei Raumtemperatur. Dann wurde eine absteigende Alkoholreihe mit zwei Mal 5 min 100%iges, 5 min 96%iges und 5 min 70%iges Ethanol durchlaufen. Die Schnitte wurden in einen hitzesterilisierten Ständer umgesetzt und dann für 5 min in DEPC-H₂O und 20 min in 0,2 N HCl inkubiert. Für 15 min wurden die Schnitte in 2x SSC bei 70 °C inkubiert und mit PBSM bei Raumtemperatur gewaschen. Um das Gewebe für die Sonde durchlässig zu machen und RNAsen abzubauen, wurde für 30 min bei 37 °C mit Proteinase K (10 µg/ml) behandelt und die Reaktion mit 0,2%igem Glycin in PBSM gestoppt. Dann erfolgte die Acetylierung entweder für 20 s in 20%iger Essigsäure bei 4 °C (Sonde 1, 2) oder in 0,25%iger Essigsäureanhydrid-10nM-Triethanolamin-Lösung (Sonde 3, 4). Nach Waschen in PBSM, Nachfixation in 4%iger Paraformaldehydlösung und einem weiteren Waschschrift begann die Prähybridisierung in 20%iger Glycerollösung für 1 h.

Die Objektträger wurden kurz in 2x SSC getaucht, 10 min bei 70 °C auf der Heizplatte erhitzt und auf einem Kühlakku (–20 °C) abgeschreckt, um Sekundärstrukturen in der RNA aufzulösen. Gleichzeitig wurden 4 bis 8 µl (1 : 50 bis 1 : 100) RNA-Sonde mit 4 µl Salmon Sperm DNA und 8 µl Yeast t-RNA gemischt und mit DEPC-H₂O auf 10 µl aufgefüllt und ebenfalls bei 70 °C für 10 min inkubiert und auf Eis abgeschreckt. Der Hybridisierungspuffer aus 52 µl DEPC-H₂O, 40 µl 20x SSC, 80 µl Dextransulfat (auf 70 °C erhitzt), 8 µl Denhardt-Reagenz und 200 µl deionisiertem Formamid wurde angesetzt und mit der Sondenmischung vermennt. 50 bis 100 µl davon wurden auf die Schnitte gegeben und mit einem sterilen Deckgläschen abgedeckt. Die Objektträger wurden in einer mit in Formamidlösung getränkten Tüchern ausgelegten Hybridisierungskammer über Nacht bei 37 bis 50 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger vier Mal jeweils 10 min bei Raumtemperatur in 4x SSC gewaschen und dann 30 min mit RNaseA/RNaseT1 bei 37 °C inkubiert, um nicht vollständig gebundene RNA-Sonden zu verdauen. Durch stringente Waschung in unterschiedlichen Konzentrationen von SSC-Puffer (Tab. 3.1) wurden weiter nicht korrekt gepaarte Sonden entfernt.

Tab. 3.1 Hybridisierungs- und Waschprotokoll bei der In-situ-Hybridisierung

Protokoll	<u>Hybridisierungs-/Waschtemperaturen</u>			
	Sonde 1	Sonde 2	Sonde 3	Sonde 4
Hybridisierung über Nacht	37 °C	48 °C	40 °C	42 °C
vier Mal 5 min 4x SSC	37 °C	37 °C	40 °C	40 °C
20 min 2x SSC	60 °C	60 °C + 20 % Formamid	63 °C	63 °C
20 min 0,2x SSC	42 °C	42 °C + 30 % Formamid	45 °C	45 °C
5 min 0,1x SSC	RT	RT	RT	RT
5 min 2x SSC	RT	RT	RT	RT

Die gepaarten Sonden wurden über eine Immunhistochemie mit einem Digoxigeninantikörper nachgewiesen. Hierzu wurde zunächst 10 min in TNMT bei Raumtemperatur, danach 1 h in 3%iger BSA-Blockierlösung und dann über Nacht bei 4 °C in 1%iger BSA in TNMT-Lösung mit 1 : 500 Anti-DIG-AP-Antikörper inkubiert.

Ungebundener Antikörper wurde am nächsten Tag zwei Mal jeweils 10 min in TNMT abgewaschen, und die Schnitte wurden dann 5 min in 1x NTB und 5 min in 1x NTB + 0,5 % 1 M Levamisol inkubiert. Danach wurde mit frisch filtrierter NBT-BCIP-Lösung als Substrat für die Alkalische Phosphatase im Dunklen inkubiert, bis sich bei mikroskopischer Kontrolle eine Lilafärbung erkennen ließ. Die Objektträger wurden sodann noch einmal für 5 min in der Levamisollösung inkubiert und in ddH₂O gewaschen. Das Eindeckeln erfolgte mit Glycerolgelatine.

3.7 Radioaktive Transportmessungen

Um aufzuklären, ob der humane SLC10A5 eine Transportaktivität im Zellkulturmodell aufweist, wurden Transportstudien an permeabilisierten und ganzen HEK293-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die stabil transfizierten Zelllinien HEK-SLC10A5-V5 und HEK-NTCP-Flag sowie die untransfizierte Ausgangszelllinie HEK293 als Kontrolle verwendet.

Die Zellen wurden in Poly-L-Lysin-beschichteten 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät und bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Bei den HEK-NTCP-Flag-Zellen wurde durch Zugabe von 1 µg/ml Tetrazyklin zwei Tage vor dem Transportversuch die NTCP-Proteinbildung induziert. Die Zellkulturplatten wurden mit Hilfe eines heißen Drahts in Streifen von je vier Wells geschnitten.

3.7.1 Transportmessung an Digitonin-permeabilisierten HEK293-Zellen

Für die Messung an Digiton-permeabilisierten Zellen wurde ein von Frau Stephanie Schmidt am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen auf Grundlage der Publikation von Erickson et al. (1992) etabliertes Protokoll verwendet. Aus der radioaktiven Heißsubstanz und der in DMSO vorgelösten Kaltsubstanz wurde eine konzentrierte Stocklösung hergestellt, mit der die gewünschte Konzentration im Transportpuffer eingestellt wurde. Um unter der zytotoxischen Schwelle des DMSO für die HEK293-Zellen zu bleiben, betrug die Endkonzentration weniger als 0,5 %. Die eine Hälfte des Transportpuffers wurde im Wasserbad auf 37 °C gewärmt, die andere auf Eis gekühlt.

Zur Vorbehandlung der Zellen wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, und die Zellen wurden drei Mal mit Intrazellularpuffer gewaschen. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 15 µM Digitonin-Puffer für 10 min bei 37 °C. Dieses führt zu einer selektiven Permeabilisierung der Zellmembran, lässt jedoch die Organellenmembranen intakt.

Der Transport fand über 15 min bei 37 °C auf der Wärmeplatte oder 4 °C auf Eis in 300 µl Transportpuffer statt. Er wurde durch fünfmaliges Waschen in eiskaltem PBS gestoppt.

3.7.2 Transportmessung an intakten HEK293-Zellen

Aus der radioaktiven Heißsubstanz und der in DMSO vorgelösten Kaltsubstanz wurde eine konzentrierte Stocklösung hergestellt, mit der die gewünschte Konzentration im Na⁺-haltigen und Na⁺-freien Transportpuffer eingestellt wurde. Um unter der zytotoxischen Schwelle des DMSO für die HEK293-Zellen zu bleiben, betrug die Endkonzentration weniger als 0,5 %. Die Transportpuffer wurden im Wasserbad auf 37 °C gewärmt. Zur Vorbehandlung der Zel-

len wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen wurden drei Mal mit PBS (37 °C) gewaschen und für 15 min bei 37 °C in Na⁺-haltigen oder Na⁺-freien Transportpuffer vorinkubiert. Nach Abziehen des Puffers begann der Aufnahmeversuch durch Zugabe von 300 µl des entsprechenden Transportpuffers mit gelöster Gallensäure. Der Transport fand über 30 min bei 37 °C auf der Wärmeplatte statt und wurde durch fünfmaliges Waschen in eiskaltem PBS gestoppt.

3.7.3 Bestimmung von Radioaktivität und Proteingehalt

Die vollständig getrockneten Zellen wurden durch Zugabe von 400 µl Lysepuffer je Well über Nacht bei 37 °C lysiert. 250 µl des Lysats wurden in Minivials überführt, mit 3 ml Szintillationsöl versetzt und im Flüssigszintillationscounter die Zerfälle des Tritiums gemessen.

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde eine modifizierte Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt (Lowry et al. 1951). Dafür wurde aus jedem Well drei Mal 20 µl in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. Eine Standardreihe aus bovinem Serumalbumin (0 bis 800 µg/ml) wurde in Dreifachbestimmung mitaufgetragen. 200 µl Lösung C wurden jeweils dazugegeben. Nach einer Wartezeit von 15 min wurden 40 µl Folinlösung zugefügt, und es wurde für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Farbreaktion wurde bei 655 nm im ELISA-Reader gemessen. Aus den Extinktionen der Standardreihe ließ sich mittels linearer Regression eine Eichgerade errechnen, anhand derer die Proteinkonzentration der einzelnen Proben bestimmt werden konnte. Der Gehalt an Gallensäure in den Zellen bezogen auf die Gesamtproteinmenge (pmol/mg Protein) wurde durch Einbeziehen des prozentualen Heißanteils und substanzspezifischer Umrechnungsfaktoren errechnet.

3.8 Versuchstiere

3.8.1 Die *Slc10a5*-Knockout-Maus

Die *Slc10a5*-Knockout-Maus wurde von TIGM (Texas A&M Institute for Genomic Medicine) als zwei heterozygote B6x129S5 (C57BL/6Nx129SvEvBrd) Zuchtpärchen bezogen. Bei dieser Maus ist durch einen gezielten Austausch (*Gene targeting* Strategie) des einen codierenden Exons des *Slc10a5* gegen eine LacZ/Neomycinresistenzkassette der proteincodierende Teil des *Slc10a5*-Gens vollständig entfernt worden. Somit kommt es zu einem kompletten Ausfall der Bildung des SLC10A5-Proteins.

3.8.2 Rückkreuzung

Die Rückkreuzung einer Hybridmaus auf einen der beiden Elternstämme dient dazu, einen kongenen Mausstamm zu erzeugen. Bei diesem handelt es sich um einen Inzuchtstamm, der sich nur an einem genetischen Locus, in diesem Fall dem ausgeknockten Gen, unterscheidet. Dadurch können phänotypische Unterschiede allein mit dem Fehlen des Gens und nicht mit mausstammspezifischen Unterschieden korreliert werden. Die erste Generation des Hybridstammes wird als F1 (Filialgeneration 1) bezeichnet. Werden diese Tiere zurückgekreuzt, so werden die folgenden Generationen in N (Nummer der Rückkreuzungsgeneration) angegeben. Ab Generation N10 spricht man von einem kongenen Stamm, ab N5 werden die Tiere als inzipient kongen bezeichnet.

Da die *Slc10a5*-Knockout-Maus als Hybridtier zwischen C57BL/6N und 129SvEvBrd erstellt wurde, erfolgte die Rückkreuzung auf den C57BL/6N Stamm. Bei der Rückkreuzung wurde in der ersten Anpaarung ein B6x129S5-Weibchen mit einem B6-Männchen verpaart, um das Y-Chromosom des B6-Stamms zu fixieren. Danach erfolgten jeweils Anpaarungen der B6x129S5-Männchen mit B6-Weibchen (Abb. 3.2).

Um den Prozess der Rückkreuzung zu beschleunigen, kann auf *Speed Congenics*-Programme zurückgegriffen werden. Hierbei werden in der Regel die männlichen Nachkommen einer Rückkreuzungsrunde mithilfe von Einzelnukleotidpolymorphismen- oder Mikrosatellitenanalyse auf ihren Verwandtschaftsgrad zum Rezipientenstamm (Inzuchtstamm, auf den zurückgekreuzt wird) untersucht. Die verwendeten Marker sind dabei gleichmäßig über die verschiedenen Chromosomen verteilt, um sowohl die Kontamination an gekoppelten (gleiches Chromosom) als auch ungekoppelten Genloci (anderes Chromosom) detektieren zu können. Während sich der Donoranteil von Genen, die nicht auf dem gleichen Chromosom liegen, schnell vermindern lässt, können Genabschnitte auf dem selben Chromosom nur durch *Crossing over* während der Meiose ausgetauscht werden. Somit spielen in späteren Rückkreuzungsrunden vor allem die Marker eine Rolle, die nahe am Genort des ausgeknockten Gens liegen.

Während der Zucht und der Rückkreuzung der *Slc10a5*-Knockout-Maus wurde dreimal das *Speed Congenics*-Programm von Taconic verwendet (*1449 Marker SNP for Speed Congenics*, Taconic, Rensselaer, NY, USA), bei dem 1449 Einzelnukleotidpolymorphismen getestet werden. Dafür wurde jeweils die Schwanzspitze der Maus in 70 % Ethanol in einem 0,65-ml-Reaktionsgefäß versendet. Die Ergebnisse der Analyse wurden als Exceltabelle für die einzelnen SNPs zur Verfügung gestellt, die Übereinstimmung mit dem Rezipientenstamm in % und ebenfalls das Generationsequivalent (NE) waren angegeben. Zusätzlich wurden die zwei geeignetsten Männchen für die nächste Rückkreuzungsrunde benannt.

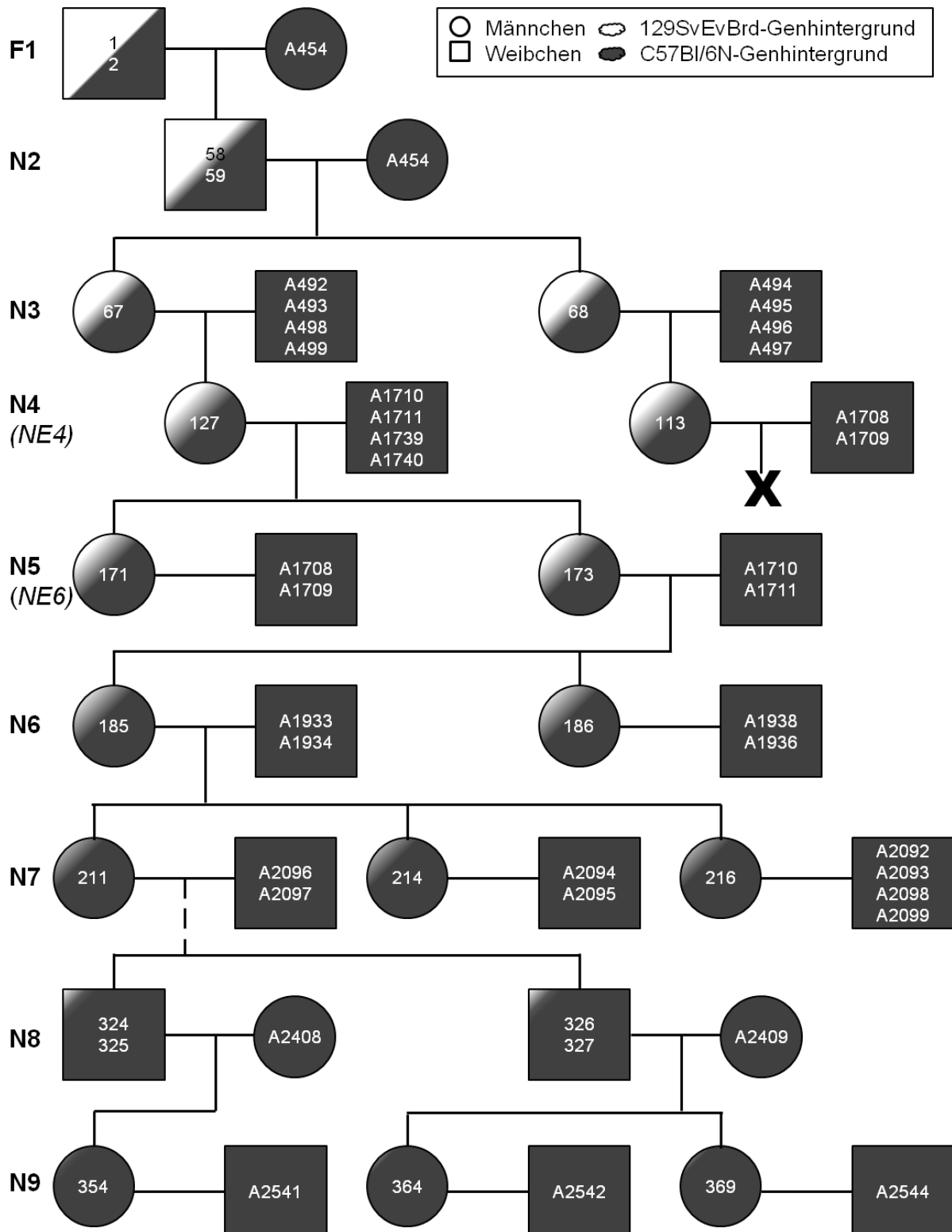


Abb. 3.2 Schematische Darstellung der Rückkreuzung der *Slc10a5*-Knockout-Maus

Es wurden zunächst die weiblichen F1-Hybriden mit einer männlichen C57/BL6NTac-Maus verpaart und in den kommenden Generationen die Männchen mit C57BL/6NTac-Weibchen verpaart. Die Generationen der Rückkreuzung sind als F1 bis N9 angegeben und zusätzlich das aus der *Speed Congenics* SNP Analyse bestimmte Generationsäquivalent NE. Zwischen N7 und N8 erfolgte eine heterozygote Anpaarung der Mäuse, um homozygote *Slc10a5*-Knockout-Mäuse zu erzeugen. Homozygote Weibchen wurden danach auch verwendet, um die Rückkreuzung fortzuführen.

3.8.3 Genotypisierung der *Slc10a5*-Knockout-Maus-Linie

Um die *Slc10a5*-Knockout-Maus-Linie zu genotypisieren, musste zunächst DNA aus Schwanzspitzen oder Ohrstanzen gewonnen werden. Hierfür wurde eine alkalische Lyse unter Hitzeeinwirkung mit anschließender Neutralisierung gewählt. Das Protokoll wurde auf Grundlage der Methode von Truett etabliert (Truett et al. 2000).

Hierbei wurde das Gewebestück in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß mit 75 µl Lysepuffer bedeckt und für 45 min bei 96 °C im Thermoschüttler bei 300 rpm inkubiert. Die Probe kühlte kurz auf Eis ab, bevor 75 µl Neutralisationspuffer zugegeben und gemischt wurde. Von diesem Gewebelysat wurden 3 µl in die Genotypisierungs-PCR eingesetzt.

Genotypisierungs-PCR

Die Genotypisierungs-PCR wurde in zwei getrennten Reaktionsansätzen durchgeführt. Zum Nachweis des Wildtyp-Allels wurden die Primer P5-PCR-wt-7-f und P5-PCR-wt-8 eingesetzt, die ein 335 bp langes Fragment der *Slc10a5*-DNA amplifizieren. Das Knockoutallel wurde mit den Primern P5-PCR-m-Neo3a_f und P5-PCR-m_L-r nachgewiesen, die 363 bp der *Targeting Vector*-Sequenz nachweisen (Abb. 3.3).

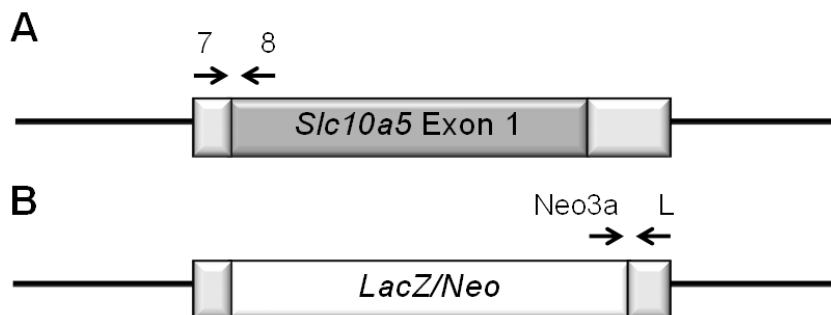


Abb. 3.3 Schematische Darstellung des *Slc10a5*-Genlocus bei Knockout- und Wildtyp-Maus

(A) Das *Slc10a5*-Gen setzt sich aus einem codierenden Exon mit kurzem 5'-UTR und längerem 3'-UTR zusammen. Bei der Wildtyp-PCR bindet der Vorwärtsprimer 7 im 5'-UTR und der Rückwärtsprimer 8 am Anfang des Exon 1.

(B) Bei den *Slc10a5*-Knockout-Mäusen ist das codierende Exon des *Slc10a5*-Gens sowie ein Teil des 3'-UTR durch eine LacZ/Neomycin-Selektionskassette ausgetauscht worden. Bei der Knockout-PCR bindet der Vorwärtsprimer Neo3a in der Selektionskassette und der Rückwärtsprimer im verbliebenen Abschnitt des 3'-UTRs.

Für die PCR wurde folgender Reaktionsansatz mit der Taq DNA Polymerase (Fermentas) verwendet:

10x Taq Puffer ((NH ₄) ₂ SO ₄)	4 µl
10 mM dNTPs	1 µl
25 mM MgCl	3,2µl
Primer vorwärts	2 µl
Primer rückwärts	2 µl
Taq DNA Polymerase 5 I. E./µl	0,2 µl
ddH ₂ O	24,6 µl
Schwanzlysat	3 µl

Die Genotypisierungs-PCR wurde auf dem Primus 96 advanced gradient Thermocycler (PeqLab) nach folgendem Schema durchgeführt:

Denaturierung	2 min	95 °C	} 6x
Denaturierung	17 s	98 °C	
Primer-Anlagerung	15 s	69 °C -1 °C/Zyklus	
Elongation	15 s	72 °C	
Denaturierung	17 s	98 °C	} 35x
Primer-Anlagerung	15 s	60 °C	
Elongation	15 s	72 °C	
finale Elongation	7 min	72 °C	
Kühlung	∞	8 °C	

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese in 1,9%igem Agarosegel.

3.8.4 Galleausscheidungsversuch *Slc10a5*-Knockout-Maus

Das Gallensäureprofil der *Slc10a5*-Knockout-Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus sollte durch Analyse der Gallensäuren in Blut und Galle bestimmt werden. Um potenzielle Kompensationsmechanismen auszuhebeln, wurde vorher eine Woche gallensäurehaltiges Futter gegeben. Die Zuteilung zu den Fütterungsgruppen erfolgte über die Vergabe von Zufallszahlen.

Genotyp		
Fütterung	<i>Slc10a5</i> -Wildtyp	<i>Slc10a5</i> -Knockout
	0,5 % Cholsäurefutter	0,5 % Cholsäurefutter
	n = 4	n = 4
	<i>Slc10a5</i> -Wildtyp	<i>Slc10a5</i> -Knockout
	Kontrollfutter	Kontrollfutter
	n = 4	n = 4

Für den Versuch eingesetzt wurden inzipient kongene *Slc10a5*-Knockout-Mäuse (B6.129S5-*Slc10a5*^{tm1Lex}) der Rückkreuzungsgeneration N7 (99,4 bis 99,5 % B6). Als Kontrolltiere dienten zugekaufte C57BL/6NTac-Mäuse (Taconic, Dänemark). Es wurden nur männliche Tiere eingesetzt. Zu Versuchsbeginn hatten die Mäuse ein Alter von fünfzehn Wochen.

Die Mäuse wurden während des Versuchszeitraums einzeln in IVC-Käfigen (IVC-System Blue Line, Tecniplast) gehalten und über eine Woche entweder mit Kontrolldiät (1324 Ratte/Maus Haltung 10-mm-Pellets, Altromin) oder gallensäurehaltigem Futter mit 0,5 % Gewichtsanteil Cholsäure (1324 Ratte/Maus Haltung mit 0,5 % Cholsäure, Altromin) *ad libitum* gefüttert. In dieser Phase wurden die Tiere einmal täglich nachmittags gewogen.

Am siebten Tag wurden die Mäuse jeweils vormittags mit 100 mg Ketaminhydrochlorid/kg KGW und 16 mg Xylazin/kg KGW in Narkose gelegt und nach Erreichen des Toleranzstadiums in Rückenlage fixiert, der Bauch wurde mit einer Schere geschoren und desinfiziert. Durch einen etwa 1 cm langen Schnitt in der Medianen kaudal des Sternums wurde die Bauchhöhle eröffnet und der proximale Dünndarm vorgelagert. Der Gallengang wurde dann auf Höhe seiner Mündung in das Duodenum mit einem Faden ligiert. Die Gallenblase wurde mit einem PTFE-Schlauch (Bola) der Größe 0,2 mm x 0,4 mm katheterisiert und die Galle in einem 0,65-ml-Reaktionsgefäß über 30 min gesammelt. Danach wurde die maximal mögliche Blutmenge mittels Herzpunktion entnommen und die Maus durch cervikale Dislokation getötet.

Das EDTA-Blut wurde bei 2.000 g für 10 min zentrifugiert, das Plasma abgezogen und bei –20 °C gelagert. Die Galleproben wurden durch Wiegen bestimmt und die Galleproben danach bei –20 °C gelagert. Die Organe wurden gewogen und aufgeteilt für die RNA-Isolation und die histologischen Untersuchungen. Zur späteren RNA-Isolation wurde das Gewebe in kleinen Stückchen in 1 ml RNA-later Solution (Ambion) überführt, bei 4 °C gelagert und nach ein bis zwei Tagen das RNA-later abgezogen. Die Proben wurden bei –80 °C bis zur Verwendung eingefroren. Die Gewebeproben für die Histologie wurden in 4%iger PFA-Lösung für 24 h fixiert und dann in 70%iges Ethanol überführt.

3.8.5 Gallensäureanalytik

Die Analyse der Galleproben wurde von Herrn Dr. Diran Herebian im Stoffwechsellabor der Universitätsklinik Düsseldorf durchgeführt. Dabei wurden die Gallensäuren mittels UHPLC-MS/MS analysiert. Verwendet wurde ein UPLC-H-Class-System (Waters, GB) gekoppelt an ein Xevo TQ-S oder TQD triple quadruple Massenspektrometer (Waters, GB). Die Electrospray-Ionisierung erfolgte im negativen Ionisierungsmodus. Für die chromatographische Auf-

trennung wurde eine BEH-Säule (2,1 x 100 mm, 1,7 µm) verwendet. Die mobile Phase bestand aus Wasser mit 0,1 % Ameisensäure und 5 mM Ammoniumacetat (Eluent A) und Acetonitril (Eluent B). Die Analyten wurden über eine Gradientenelution aufgetrennt. Bei einer Säulentemperatur von 40 °C wurden 5 µl injiziert. Der Nachweis der Gallensäuren erfolgte im *Selected Reaction Monitoring Mode*.

Cholsäure, Deoxycholsäure, Chenodeoxycholsäure, 7-oxo-Deoxycholsäure, Lithocholsäure, Lithocholsäuresulfat, Ursodeoxycholsäure, Hyodeoxycholsäure, Muricholsäure, Glycocholsäure, Glycochenodeoxycholsäure, Glycodeoxycholsäure, Glycolithocholsäure, Glycourso-deoxycholsäure, Glycohyodeoxycholsäure, Taurocholsäure, Taurochenodeoxycholsäure, Taurodeoxycholsäure, Tauroolithocholsäure, Tauroursodeoxycholsäure, Taurohyodeoxycholsäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurden als Standardsubstanzen verwendet. Die deuterierten Gallensäuren d4-Cholsäure, d4-Glycocholsäure und d4-Glycochenodeoxycholsäure (Steraloids, Newport, USA) dienten als interne Standards. Taurinkonjugierte α - und β -Muricholsäure wurden über Standards (Steraloids) bestätigt, aber nicht auf der UPLC-Säule aufgetrennt und als Tauromuricholsäure zusammengefasst. Für die glycinkonjugierte α -, β - und ω -Muricholsäure und Tauro-7-oxo-Deoxycholsäure waren keine Standardsubstanzen erhältlich, sie wurden aus der m/z-Retentionszeit und dem Fragmentierungsmuster abgeleitet.

3.9 Statistische Auswertung

Das Erstellen von Graphen und die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software, Inc.) durchgeführt. In der Planung des Galleausscheidungsversuchs wurde ein α -Fehler von 0,05 und β -Fehler von 0,2 zugrundegelegt. Die Auswertung der vier Gruppen des Galleausscheidungsversuches wurde mittels zweifaktorieller Anova mit Bonferroni-Post-Test mit den Faktoren Fütterung und Genotyp vorgenommen. Die Normalverteilung der untersuchten Parameter wurde angenommen, konnte aber aufgrund der Stichprobengröße von $n = 4$ nicht untersucht werden. Die Homogenität der Varianzen konnte nicht immer eingehalten werden.

Bei Auswertungen, bei denen zwei Gruppen miteinander verglichen wurden, kam der zweiseitige t-Test zur Anwendung. Die Werte werden standardmäßig als Mittelwert mit Standardabweichung (MW \pm SD) angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 SLC10A5-Expression und Lokalisation

4.1.1 Expressionsprofil in verwendeten Zelllinien

Von den in der vorliegenden Arbeit für *In-vitro*-Versuche eingesetzten Zellen wurde die Expression der *SLC10A5*-mRNA bestimmt. Hierfür wurde sowohl eine konventionelle Reverse-Transkriptase-PCR als auch eine quantitative Real-Time-PCR durchgeführt (Abb. 4.1). Es konnte damit gezeigt werden, dass in den HEK293-Zellen, obwohl diese embryonale Nierenzellen darstellen, keine *SLC10A5*-mRNA nachweisbar war. In den HepG2-Zellen, einer von Hepatomzellen abgeleiteten Zelllinie, konnte hingegen eine moderate Expression detektiert werden. Die stabil transfizierten HEK-SLC10A5-V5-Zellen bildeten – wie erwartet – eine große Menge *SLC10A5*-mRNA.

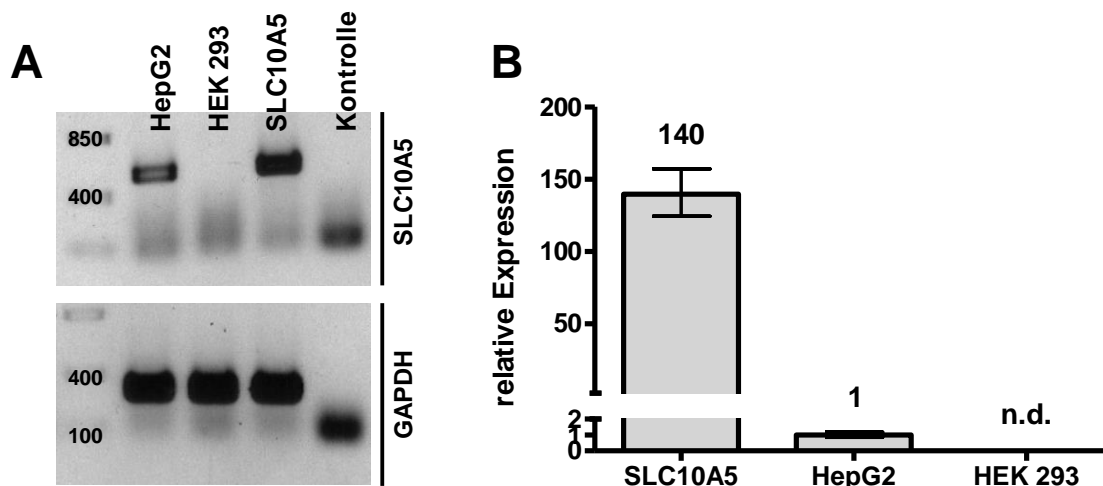


Abb. 4.1 Expression von *SLC10A5* in HEK-SLC10A5-V5-, HepG2- und HEK293-Zellen

(A) In einer RT-PCR wurde die Expression von *SLC10A5* auf RNA-Ebene in den stabil transfizierten HEK-SLC10A5-V5-Zellen sowie in nicht transfizierten HepG2- und HEK293-Zellen überprüft. Die isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben, amplifiziert und auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragen. In den HepG2- und den HEK-SLC10A5-V5-Zellen konnte das erwartete Amplifikat von 527 bp nachgewiesen werden, während in den HEK293-Zellen keine Bande auftrat. Als endogene Kontrolle wurde GAPDH eingesetzt und eine Kontrolle ohne cDNA mitgeführt.

(B) Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde cDNA der drei Zelltypen in die Real-Time-PCR eingesetzt. Die relative Expression des humanen *SLC10A5* wurde mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode bestimmt und als $MW \pm SD$ der Dreifachbestimmung angegeben. Als Kontrollgen (Housekeeper) diente *ACTB*. Eine 140-fach höhere Expression wurde in den HEK-SLC10A5-V5-Zellen im Vergleich zu den HepG2-Zellen gefunden. In den HEK293-Zellen konnte bis Zyklus 40 kein *SLC10A5*-Transkript detektiert werden.

4.1.2 *Slc10a5*-Gewebeexpression in der Maus

Um die *Slc10a5*-Expression der Maus von einem definierten Mausstamm, dem genetischen Hintergrundstamm der in der Arbeit verwendeten *Slc10a5*-Knockout-Maus, zu zeigen, wurde eine quantitative Real-Time-PCR aus Geweben der C57BL/6NTac-Maus durchgeführt (Abb. 4.2). Hierbei konnten Leber und Niere als die am höchsten exprimierenden Organe bestätigt werden. Es konnte aber auch eine hohe Expression im gesamten Darmtrakt (Dünn- und Dickdarm) gezeigt werden sowie eine moderate Expression in Magen, Lunge und Hoden.

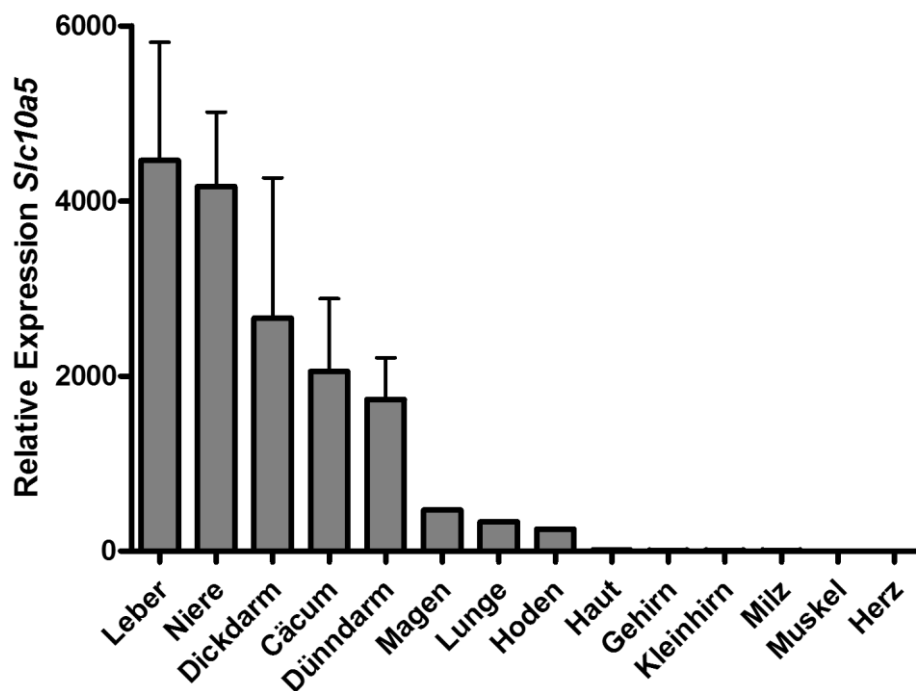


Abb. 4.2 Expressionsprofil der *Slc10a5*-RNA in verschiedenen Mausgeweben

Totale RNA wurde aus C57BL/6NTac-Mausgewebe isoliert, aufgereinigt, in cDNA umgeschrieben und in Dreifachbestimmung in die quantitative Real-Time-PCR eingesetzt. Es wurde auf den Housekeeper *Hprt* normalisiert und die relative Expression mittels $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode mit dem Herzen als Kalibrator berechnet. Dargestellt sind die MW \pm SD aus $n = 4$ Mäusen für Leber, Niere, Dickdarm, Cäcum und Dünndarm bzw. der MW der technischen Replikate einer Maus für die weiteren gezeigten Organe.

4.1.3 Lokalisation auf RNA-Ebene mittels *In-Situ*-Hybridisierung

Die *In-situ*-Hybridisierung an Mausgewebe sollte ergänzend zur Expressionsanalyse des *Slc10a5* mittels Real-Time-PCR zeigen, in welchen Zelltypen die *Slc10a5*-mRNA exprimiert wird. Für die Ratte wurde in einer *In-situ*-Hybridisierung gezeigt, dass Hepatozyten sowie die Zellen der proximalen Nierentubuli *Slc10a5*-RNA exprimieren (Fernandes et al. 2007). Nun sollten diese Daten durch Untersuchungen in der Maus komplettiert werden, wobei durch Verwendung von Gewebe der *Slc10a5*-Knockout-Maus verglichen mit dem der Wildtyp-

Maus mögliche Signale auf ihre Spezifität hin überprüft werden sollten. Für die *In-situ*-Hybridisierung kamen verschiedene in Abb. 4.3 gezeigte Sonden zum Einsatz.



Abb. 4.3 Lage der *In-situ*-Hybridisierungssonden in der mSlc10a5-mRNA

Dargestellt ist der vordere Teil der *Slc10a5*-mRNA der Maus. Der proteincodierende Bereich (CDS) erstreckt sich von Position 60 bis 1399 (mit Klammern markiert). In der *Slc10a5*-Knockout-Maus wurde die Sequenz bis einschließlich Base 1539 deletiert. Die Sonde 1 (Lila) sitzt im 3'UTR. Sonde 2 (Blau) erstreckt sich vom Ende des CDS in den Anfangsbereich des 3'UTR. Für die Sonde 3 (Rot) wurde ein Stück zwischen 5'UTR und dem Anfang des CDS gewählt, während Sonde 4 (Orange) zwischen Sonde 2 und den Sonden von Eurexpress und Allen Brain Atlas (Grün) liegt.

Zunächst wurde Sonde 1 synthetisiert, die im 3'UTR des *Slc10a5*-Gens liegt. Sie detektierte *Slc10a5*-RNA in allen Hepatozyten der Leber, den Mukosazellen und den Nervenzellkörpern im *Plexus myentericus* im Ileum und in den Drüsenzellen der Magenschleimhaut sowie innerhalb des Epithels der *Pars cutanea* im Magen. Allerdings reagierte diese Sonde mit dem Gewebe von Wildtyp- und Knockout-Maus gleich. Da Sonde 1 im Bereich des bei der *Slc10a5*-Knockout-Maus nicht deletierten 3'-UTRs liegt, war nicht vollständig sicher, ob die Sonde unspezifisch reagierte oder dieser RNA-Abschnitt bei der Knockout-Maus wider Erwarten transkribiert wurde. Denn die Transkription sollte durch das Poly-A-Signal am Ende der

LacZ-Neo-Kassette (siehe Abb. 3.3) abbrechen, aber es könnten ausnahmsweise auch Transkripte entstehen, die den folgenden 3'-UTR miteinbeziehen. Um die Spezifität der *In-situ*-Hybridisierung abzusichern, wurde deswegen die Sonde 2 hergestellt, die das Ende der codierenden Sequenz bis zum Anfang des 3'-UTR abdeckt und innerhalb der deletierten Sequenz bei der Knockout-Maus liegt. Diese Sonde 2 stellte sich aber als unspezifisch heraus, da bei der Hybridisierung die vom T7-Promotor transkribierte RNA-Sonde gleichermaßen wie die Sp6-Sonde in Leber, Dünndarm und Magen band.

Bei automatisierten Großprojekten wie Eurexpress (<http://www.eurexpress.org>) und Allen Brain Atlas (<http://mouse.brain-map.org>) wurden bereits Sonden verwendet, die die vordere Hälfte der codierenden Sequenz abdecken. Mit diesen Sonden wurde kein Signal in Gehirn, Rückenmark und einem Ganzkörperschnitt durch den Mäusefetus erzielt. Deswegen wurde bei der Auswahl zwei weiterer Sonden dieser Abschnitt ausgespart. Sonde 3 färbte Leber und Niere der Knockout-Maus stärker als die der Wildtyp-Maus, weswegen sie nicht weiter verwendet wurde, während Sonde 4 vor allem in der Wildtypleber eine wesentlich stärkere Färbung als in der Knockoutkontrolle hervorrief (Abb. 4.4).

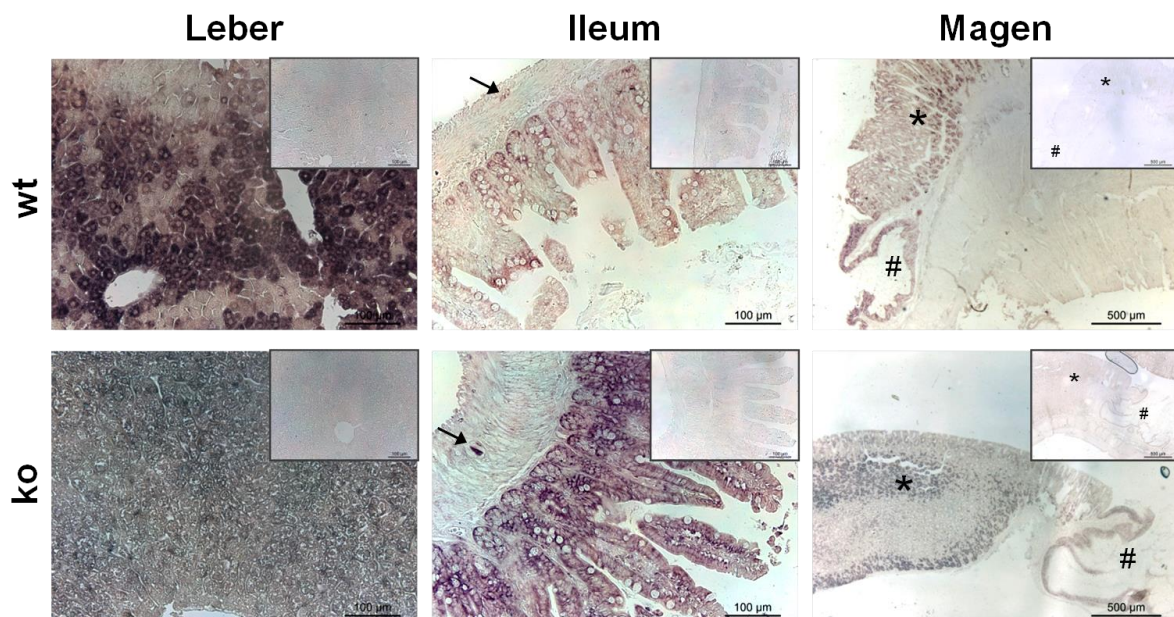


Abb. 4.4 *In-situ*-Hybridisierung von *Slc10a5* in Mausgewebe mit Sonde 4

Von 4 %-PFA-fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben von *Slc10a5*-Wildtyp- (wt) und -Knockout-Mäusen (ko) wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt. An diesen wurde eine *In-situ*-Hybridisierung mit der RNA-Sonde 4 in einer Verdünnung von 1 : 75 durchgeführt. Es erfolgte eine Nachbehandlung mit RNase A/T1. Abgebildet ist die Hybridisierung mit der vom T7-Promotor aus transkribierten T7-Sonde (großes Bild) und der Sp6-Sonde (Teilbild oben rechts). Die Sonde 4 hybridisiert in der Leber unterschiedlich stark in den Hepatozyten der Wildtyp-Maus sowie homogen, jedoch sehr viel schwächer in der Knockout-Maus. Im Ileum färben sich die Mucosazellen an sowie die Nervenzellen des *Plexus myentericus* (Pfeil). In der *Pars glandularis* (*) des Magens werden die Drüsenzellen und die kutane Schleimhaut in der *Pars non-glandularis* markiert.

An Hybridisierungen in Ileum und Magen ließ sich diese Tendenz jedoch nicht bestätigen. Die *In-situ*-Hybridisierungen mit Sonde 4 zeigten eine Lokalisation der *Slc10a5*-RNA in den Hepatozyten der Leber an. Weiterhin färbten sich die Darmmukosazellen im Ileum und die Nervenzellen des *Plexus myentericus* an. Im Magen hybridisierte die Sonde in den Drüsenzellen und der kutanen Schleimhaut. Leider färbte in diesen Schnitten der Farbstoff nachträglich stark in das Einbettmedium aus, was die Farbwiedergebung beeinträchtigt (Abb. 4.4). Die Niere stellte sich als Organ mit einer sehr hohen unspezifischen Hintergrundfärbung heraus (nicht gezeigt).

Die Populationen der angefärbten Zellen entsprachen denen, die sich auch in der Immunhistochemie mit dem rSLC10A5-Antikörper (Eurogentec) anfärbten (siehe Abb. 4.18). Genau wie bei diesem kann die Spezifität nicht abschließend bewiesen werden, da sich zum Teil das Gewebe der Knockout-Maus gleichartig anfärbte.

4.1.4 Sortierungsvorhersage

Neben der Untersuchung der Gewebeexpression interessierte in der vorliegenden Arbeit auch die subzelluläre Lokalisation des SLC10A5-Proteins. Verschiedene bioinformatische Programme wurden zur Vorhersage der zellulären Sortierung des SLC10A5-Proteins genutzt und sagten eine Lokalisation in der Plasmamembran voraus, wenn über Alignments mit sequenzhomologen Proteinen Vergleiche angestellt werden (CELLO; Euk-mPLoc 2.0). Dies verwundert nicht, werden doch die gut charakterisierten Mitglieder der SLC10-Familie (NTCP, ASBT, SOAT) in die Plasmamembran sortiert. Programme, die nach bestimmten Sequenzmerkmalen suchen, die typischerweise zu einer Sortierung in ein bestimmtes Organell führen, sagten verschiedene Möglichkeiten voraus (Tab. 4.1). Hierbei unterschieden sich die Aussagen je nachdem, ob die Proteinsequenz des Menschen, der Ratte oder der Maus für die Vorhersage verwendet wurde.

Tab. 4.1 Vorhersage der zellulären Sortierung des SLC10A5-Proteins mittels bioinformatischer Programme

Programm	Mensch	Maus	Ratte
MultiLoc	Peroxisomen (35 %) ER (3 %) Extrazellulär (13 %)	Extrazellulär (9 %) Peroxisomen (4 %) ER (3 %)	Peroxisomen (52 %) ER (19 %) Extrazellulär (14 %)
PSORTII	ER (55,6 %) Plasmamembran (33,3 %) Mitochondrien (11,1 %)	ER (52,2 %) Plasmamembran (34,8 %) Vakuolär (4,3 %) Golgi-Apparat (4,3 %) Mitochondrien (4,3 %)	Plasmamembran (43,5 %) ER (43,5 %) Vakuolär (4,3 %) Golgi-Apparat (4,3 %) Mitochondrien (4,3 %)
Y-Loc	Sekretorischer Weg (100 %)	Sekretorischer Weg (99,2 %)	Sekretorischer Weg (97 %)

Die Programme TargetP und PrediSi errechneten, dass das SLC10A5-Protein im N-Terminus ein Signal-Peptid hat, welches beim humanen SLC10A5 19 Aminosäuren und bei Ratte und Maus 18 Aminosäuren lang ist. SignalP 4 sagte eine Spaltungsstelle an Position 22 oder 19 vorher. Somit ist der gemeinsame Nenner aus diesen Vorhersagen, dass das SLC10A5-Protein den sekretorischen Weg über das Endoplasmatische Retikulum einschlägt.

Das Programm Target Signal Predictor fand im N-Terminus zusätzlich noch eine Sequenz, die auf eine Interaktion mit dem Pex19BS-Protein hinweist, was zu einer Sortierung in die peroxisomale Membran führen würde.

4.1.5 Sortierungsstudien im Zellkulturmodell

Die bisher einzige Untersuchung von Pellicoro (Diss. 2008), die zeigen sollte, in welchen Zellkompartimenten sich das SLC10A5-Protein befindet, scheiterte an der unspezifischen Reaktion von zwei selbst generierten Antikörpern. In HepG2-Zellen, die mit SLC10A5-GFP transfiziert wurden, konnte kein Signal in der Plasmamembran detektiert werden. Hingegen zeigte sich SLC10A5 intrazellulär in membranösen Strukturen, die keinem spezifischen Zellorganell zugeordnet werden konnten (Diss. Pellicoro 2008).

Diese Lokalisation konnte in der vorliegenden Arbeit an transient mit SLC10A5-GFP transfizierten HepG2-Zellen bestätigt werden, die eine intrazelluläre Fluoreszenz in vesikulär abgegrenzten Strukturen und ebenfalls keine Plasmamembranfluoreszenz aufwiesen (Abb. 4.5). Auch eine stabil transfizierte HEK-SLC10A5-GFP-Zelllinie wurde generiert (nicht gezeigt). Der GFP wies aber eine schlechte Leuchtkraft auf und konnte präzise nur mit dem GFP-Antikörper nachgewiesen werden. Da außerdem der GFP-Tag durch seine Größe möglicherweise zu einer Fehlsortierung des SLC10A5-Proteins führen könnte, wurde fortan V5-getaggttes hSLC10A5-Protein untersucht. Dieses zeigte jedoch in einem parallel angelegten Versuch bei transienter Transfektion von HepG2-Zellen dieselbe Sortierung wie entsprechend GFP- und FLAG-getaggte hSLC10A5-Proteine und ungetaggte rSLC10A5-Proteine (Abb. 4.5).

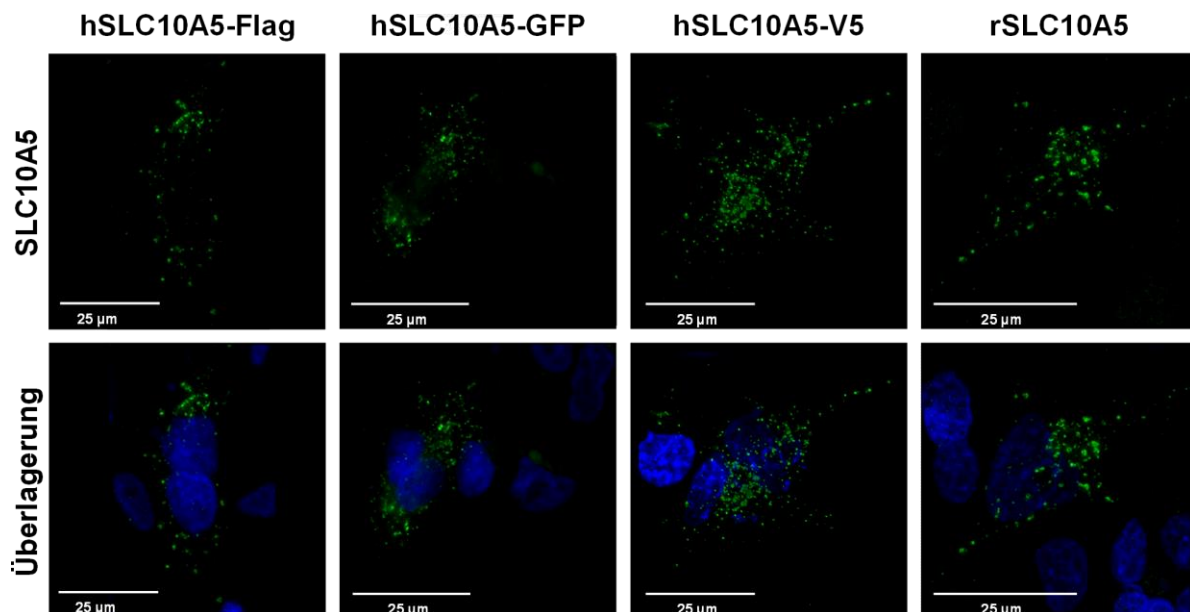


Abb. 4.5 Vergleich der intrazellulären Sortierung des Flag-, GFP- und V5-getaggtten hSLC10A5 und des ungetaggtten rSLC10A5

HepG2-Zellen wurden transient mit dem Flag-, GFP- oder V5-getaggtten SLC10A5-Konstrukt des Menschen und dem ungetaggtten SLC10A5-Konstrukt der Ratte transfiziert und mit einer Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Hierfür wurde der Flag-Ak 1 : 5.000 und der rSLC10A5-Ak 1 : 500 mit dem Sekundärantikörper AF488 Ziege-anti-Kaninchen 1 : 800 und der GFP-Ak 1 : 1000 und der Maus-V5-Ak 1 : 5.000 mit AF488 Ziege-anti-Maus 1 : 800 eingesetzt. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI/Methanol 1 : 5.000 (Blau). Von den hSLC10A5-Flag und -V5 sowie den rSLC10A5 transfizierten Zellen wurde ein Z-Stapel aufgenommen, von dem eine *Blind Deconvolution* gerechnet wurde und die Maximum-Projektion daraus dargestellt wird. Die Aufnahme von hSLC10A5-GFP stellt eine Aufnahme in einer Ebene ohne Nachbearbeitung dar. Objektivvergrößerung: 63x

An transient mit dem SLC10A5-V5-Konstrukt transfizierten HepG2-Zellen konnte auch die durch bioinformatische Vorhersagen favorisierte Orientierung des SLC10A5-Proteins bestätigt werden. Der vorhergesagte extrazelluläre N-Terminus und der intrazelluläre C-Terminus eines integralen Plasmamembranproteins würde übertragen auf ein Organell eine Orientierung des N-Terminus zum Organellenlumen und des C-Terminus zum Zytoplasma bedeuten (siehe Abb. 5.4 B). Das SLC10A5-V5-Fusionsprotein trägt den V5-Tag am C-Terminus und wurde über eine Antikörperreaktion mit dem V5-Antikörper nachgewiesen. Sowohl bei vollständig permeabilisierten Zellen als auch bei Digitonin-permeabilisierten Zellen ließ sich der C-Terminus detektieren (Abb. 4.6). Da bei der Digitonin-Permeabilisierung lediglich die Zellmembran permeabilisiert wird, sodass nur Epitope an der zytoplasmazugewandten Seite der Zellorganellen detektiert werden können, muss der C-Terminus des SLC10A5-Proteins im Zytoplasma liegen.

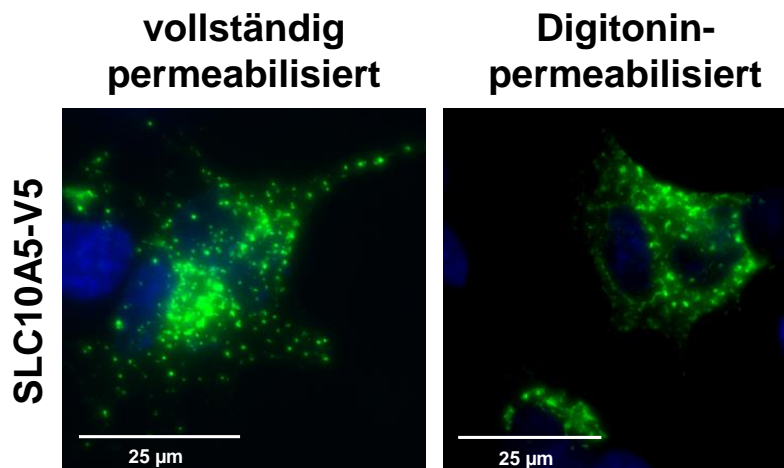


Abb. 4.6 Untersuchung der Lokalisation des C-Terminus des SLC10A5-Proteins an transient hSLC10A5-V5-transfizierten HepG2-Zellen nach vollständig und Digitoninpermeabilisierung

HepG2-Zellen wurden transient mit dem SLC10A5-V5-Konstrukt (C-terminaler V5-His-Tag) transfiziert und entweder mit 0,2 % Triton X-100 vollständig oder mit Digitonin (60 µg/ml) nur die Zellmembran permeabilisiert. Die Immunfluoreszenzmarkierung wurde mit dem Maus-V5-Ak 1 : 5.000 und dem Sekundärantikörper AF488 Ziege-anti-Maus 1 : 800 durchgeführt. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI/Methanol 1 : 5.000 (Blau). Es wurde ein Z-Stapel aufgenommen und daraus die Maximum-Projektion dargestellt. Objektivvergrößerung: 63x

Auch für weitere subzelluläre Expressionstudien wurden HepG2-Zellen verwendet, da sie von Leberzellen, den am höchsten SLC10A5 exprimierenden Zellen, abstammen und selber noch eine moderate SLC10A5-Expression aufweisen. Zusätzlich weisen die HepG2-Zellen einen großen Zytoplasma-reichen Zellkörper auf, der die Sortierung gut beobachten lässt.

Die immunzytologischen Untersuchungen zeigten, dass sich das transient transfizierte humane SLC10A5-V5-Protein in vesikulären Strukturen um den Zellkern, aber auch in kleineren Abspartungen in der Peripherie lokalisieren ließ. Die gleichzeitige Markierung des SLC10A5-V5-Fusionsproteins mit dem V5-Antikörper und den organellenspezifischen Markern sollte die Zugehörigkeit zu bestimmten Organellen zeigen. Dabei ließ sich eine fast vollständige Überlagerung mit der Markierung für Giantin, einem Markerprotein des Golgi-Apparats, darstellen. Auch der durch den Calnexin-Antikörper angefärbte ringförmige Bereich des Endoplasmatischen Retikulums um den Zellkern zeigte teilweise Überlagerungen mit der SLC10A5-Expression. Mit den durch den ATP-Synthase-Antikörper markierten Mitochondrien, durch den Katalase-Antikörper markierten Peroxisomen und den durch den Transferrinrezeptor(TfR)-Antikörper markierten Endosomen konnte kein übereinstimmendes Verteilungsmuster gesehen werden (Abb. 4.7). Somit wird SLC10A5 in den transient transfizierten HepG2-Zellen zunächst in das Endoplasmatische Retikulum und dann in den Golgi-Apparat sortiert. Kleinere vesikuläre Strukturen, die nicht mit Giantin komarkiert wurden, konnten nicht näher zugeordnet werden.

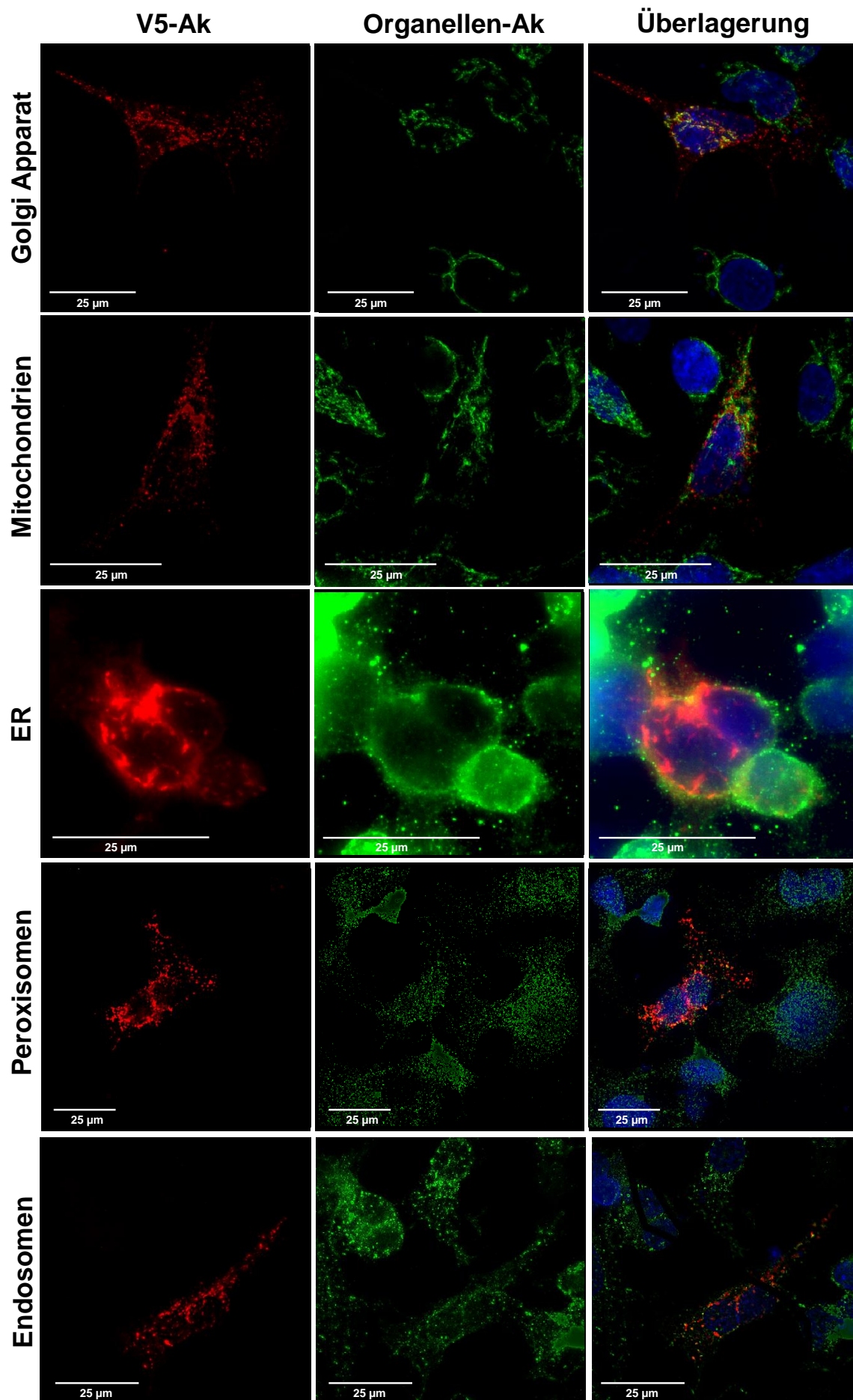
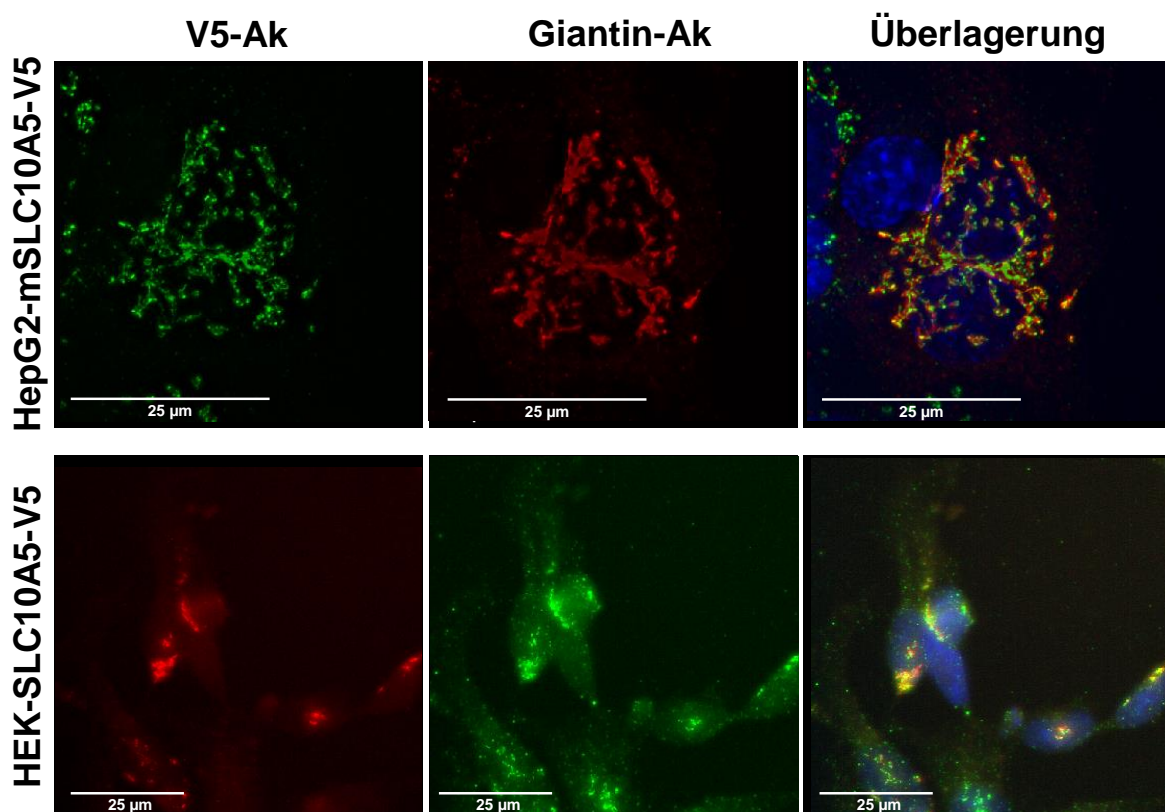


Abb. 4.7 Subzelluläre Lokalisation des SLC10A5-Proteins in transfizierten HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden mit dem SLC10A5-V5-Konstrukt transient transfiziert und nach 48 Stunden wurden Immunfluoreszenzstudien durchgeführt. Das SLC10A5-Protein wurde dabei mittels V5-Antikörper (Kaninchen-V5 1 : 5000, Maus-V5 1 : 5000) markiert. Die Zellorganellen folgendermaßen: Golgi-Apparat (Giantin-Ak 1 : 500), Mitochondrien (ATP-Synthase-Ak 1 : 400), Endoplasmatisches Retikulum (Calnexin-Ak 1 : 250), Peroxisomen (Katalase-Ak 1 : 1000), Endosomen (TfR-Ak 1 : 300). Als Sekundärantikörper wurden AF555 Ziege-anti-Kaninchen und AF488 Ziege-anti-Maus oder AF488 Ziege-anti-Kaninchen und Cy3 Ziege-anti-Maus jeweils 1:800 verwendet. Die Farbkanäle bei der Mikroskopie wurden so eingestellt, dass das SLC10A5-Protein in Rot und die Organellen in Grün dargestellt sind. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI/Methanol 1 : 5000 (Blau). Aufgenommen wurde ein Z-Stapel, von dem eine *Blind Deconvolution* (Ausnahme ER) gerechnet wurde und die Maximum-Projektion daraus dargestellt wird. Objektivvergrößerung 63x

Die Kolokalisation des SLC10A5-Proteins mit dem Golgi-Apparat-Marker Giantin konnte ebenso an mit dem Maus-Slc10a5-V5-Konstrukt transfizierten HepG2-Zellen bestätigt werden. Auch in den HEK-SLC10A5-V5-Zellen konnte eine sehr kompakte Lokalisation des SLC10A5-Proteins detektiert werden, welche fast vollständig mit dem durch Giantin markierten Golgi-Apparat übereinstimmt (Abb. 4.8).

**Abb. 4.8 Lokalisation des SLC10A5-Proteins in transient mSlc10a5-V5-transfizierten HepG2-Zellen und stabil transfizierten HEK-SLC10A5-V5-Zellen**

Sowohl an transient mit dem mSlc10a5-V5-Konstrukt transfizierten HepG2-Zellen als auch stabil hSLC10A5 exprimierenden HEK-SLC10A5-V5-Zellen wurde eine Doppelimmunmarkierung durchgeführt, bei der das SLC10A5-V5-Fusionsprotein mit dem Kaninchen-V5-Antikörper (1 : 5000) und der Golgi-Apparat mit dem Giantin-Antikörper (1 : 500) markiert wurden. Als Sekundärantikörper wurden AF555 Ziege-anti-Kaninchen und AF488 Ziege-anti-Maus (jeweils 1 : 800) eingesetzt. Objektivvergrößerung: 63x

4.2 Antikörperetablierung

Um auch nicht Tag-markiertes SLC10A5-Protein detektieren und natürlich gebildetes SLC10A5 in Zellen und Gewebe nachweisen zu können, wurden Antikörper gegen das SLC10A5-Protein benötigt. Es standen zwei kommerziell erhältliche Antikörper gegen den humanen SLC10A5 zur Verfügung und ein selbst in Auftrag gegebener Antikörper gegen das SLC10A5-Protein der Ratte. Diese Antikörper wurden mittels Immunfloreszenz, Western Blot und Immunhistologie überprüft.

4.2.1 hSLC10A5-Antikörper (Sigma)

Der SLC10A5-Antikörper richtet sich gegen einen Teil des N-Terminus und die putative erste Transmembrandomäne des humanen SLC10A5-Proteins. An transient hSLC10A5-V5- und mSlc10a5-V5-transfizierten HepG2-Zellen wurde die Speziesreaktivität gegen Maus und Mensch und die Spezifität für die gebildeten Fusionsproteine untersucht (Abb. 4.9).

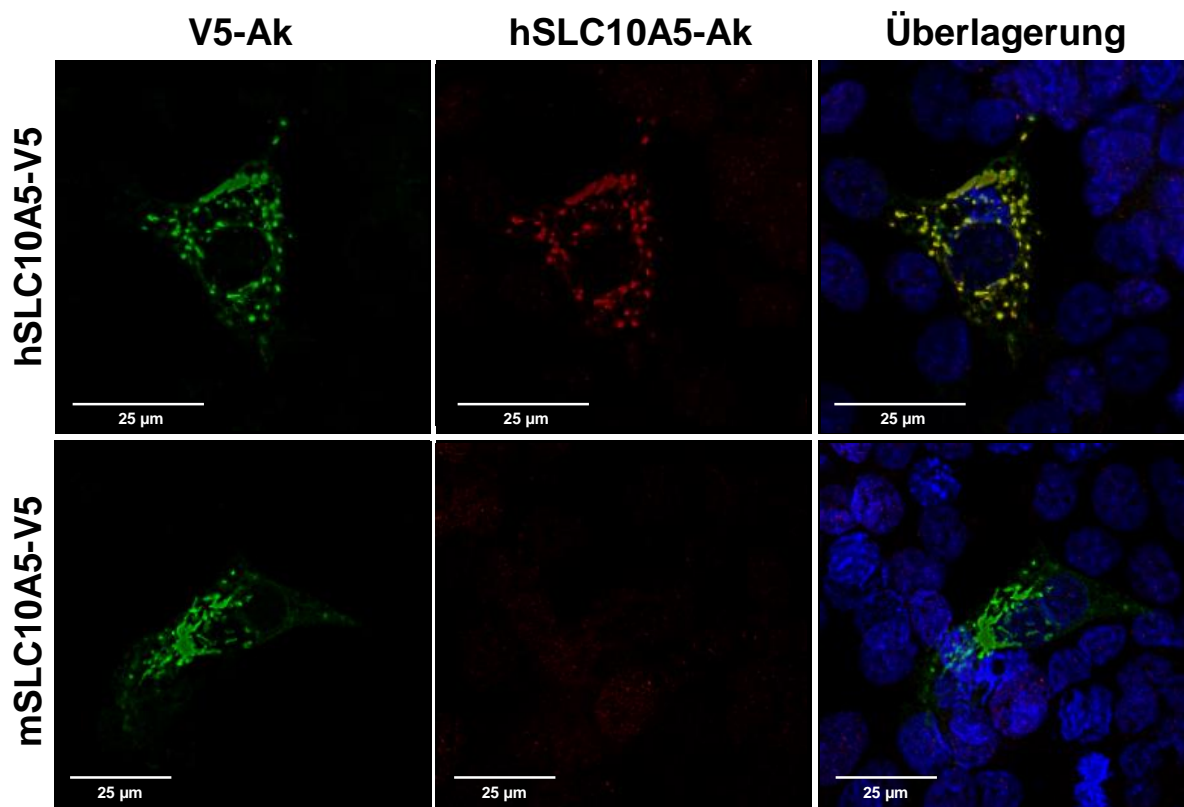


Abb. 4.9 Untersuchung zur Speziesreaktivität des SLC10A5-Ak (Sigma) an hSLC10A5- und mSlc10a5-transfizierten HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden transient mit dem humanen SLC10A5-V5- oder dem mSlc10a5-V5-Konstrukt transfiziert. Für die Immunfluoreszenzanalyse der exprimierten Proteine erfolgte die Markierung mit dem Maus-V5-Ak (1 : 5000) und dem hSLC10A5-Ak (Sigma) (1 : 200) sowie mit den Sekundärantikörpern AF488 Ziege-anti-Maus und Cy3 Ziege-anti-Kaninchen (jeweils 1 : 800). Die Zellkerne wurden mit DAPI/PBS (1 : 5000) gefärbt. Als Negativkontrolle dienten die untransfizierten Nachbarzellen. Es wurden jeweils Z-Stapel-Aufnahmen angefertigt, die *Blind Deconvolution* wurde gerechnet und die Maximum-Projektion der Ebenen abgebildet. Objektivvergrößerung: 40x

Bei Zellen, die das hSLC10A5-V5-Protein exprimieren, überlagert sich die Immunfluoreszenz durch den SLC10A5-Antikörper gänzlich mit der durch den V5-Antikörper, wie an der vollständigen Gelbfärbung in der Überlagerungsdarstellung zu erkennen ist. Wurde jedoch das mSLC10A5-Protein in den Zellen gebildet, so reagierte der Antikörper offensichtlich nicht spezifisch damit und zeigte kein Fluoreszenzsignal. Dabei wurde die erfolgreiche Transfektion durch den V5-Antikörper angezeigt (Abb. 4.9).

Da die Sequenzidentität zwischen Maus und Mensch im Bereich des Immunisierungspeptids nur 64,8 % beträgt, ist dieses Ergebnis nicht verwunderlich (Abb. 4.10).

Ratte	95	GETNLTMLQWSEGRQTRLIEETITNIRVSVFRQTEDSLFQEPPIHVNSSVFLLVLMILLNKCAFGCKIELQV
Maus	95	GETNVTLLQLWESEGRQTLIDELKNVRVRFVFRQTDSSLQAPIHVDSSIFLLVLSMILLNKCAFGCKIEFQV
Mensch	96	GETNVTLLQLWDEGRQERLIEEIKNVKVKVLKQ-KDSSLQAPMHIDRNILMLILPEILLNKCAFGCKIELQL

Abb. 4.10 Vergleich der SLC10A5-Aminosäuresequenz von Ratte, Maus und Mensch im Bereich des Immunisierungsepitops des hSLC10A5-Antikörpers (Sigma)

Um zu untersuchen, ob im Zellkulturmodell auch endogen exprimiertes SLC10A5-Protein von diesem hSLC10A5-Antikörper erkannt wird, wurde der direkte Vergleich zwischen den HEK-SLC10A5-V5-Zellen, den HEK293-Zellen als Negativkontrolle und den HepG2-Zellen mit nativer Expression gewählt. Hierbei wurde das bei den stabil transfizierten HEK-SLC10A5-V5-Zellen gebildete Fusionsprotein erkannt (Abb. 4.11 links). Bei den nativ SLC10A5 exprimierenden HepG2-Zellen, kann jedoch kein spezifisches Signal für den SLC10A5-Antikörper gesehen werden (Abb. 4.11 Mitte), sondern vor allem eine punktförmige Anfärbung im Bereich des Zellkerns, die genauso bei den nicht SLC10A5 exprimierenden HEK293-Zellen (Abb. 4.11 rechts) auftritt. Somit kann der SLC10A5-Antikörper das natürlicherweise gebildete Protein entweder nicht erkennen oder in den HepG2-Zellen findet keine ausreichende Proteinbiosynthese für SLC10A5 statt, um die Detektionsschwelle des Antikörpers zu überschreiten. Da die mRNA-Expression in den HEK-SLC10A5-V5-Zellen 140-fach stärker ist als in den HepG2-Zellen ist, könnte auch die translatierte Proteinmenge wesentlich geringer sein.

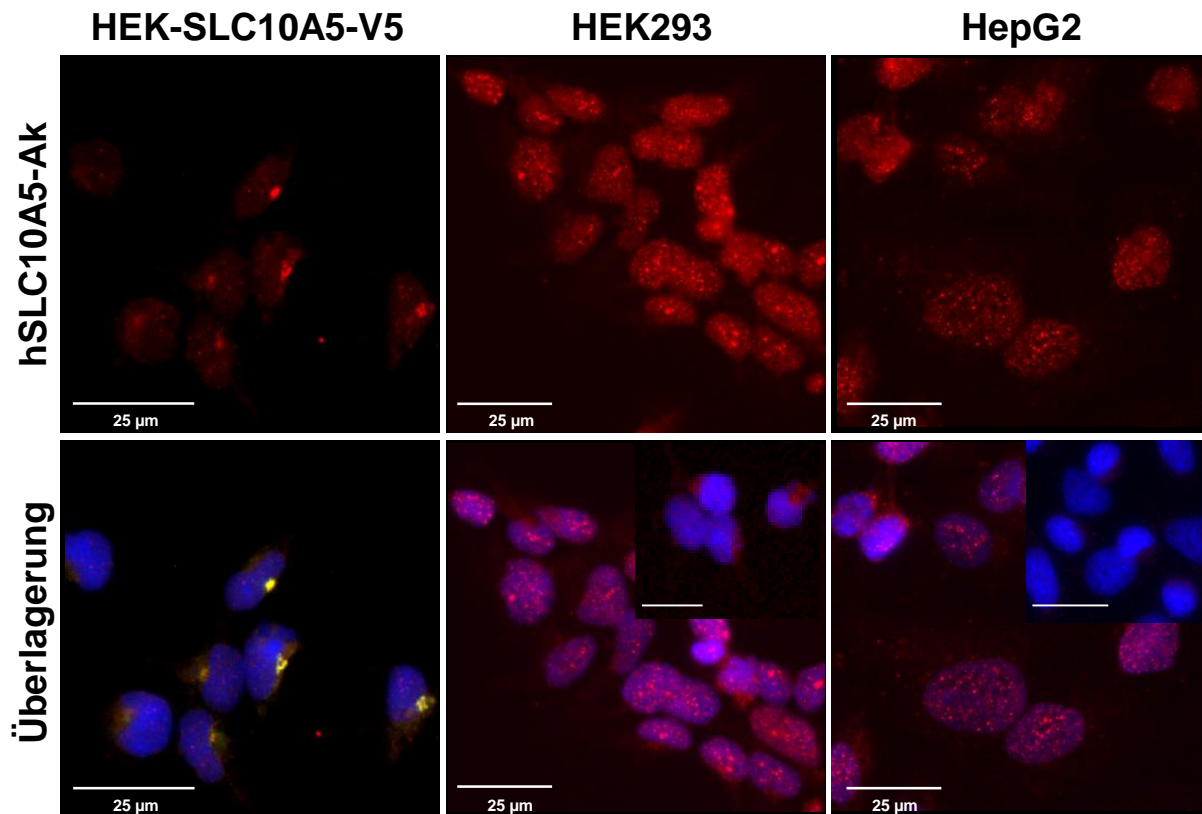


Abb. 4.11 Untersuchung der Spezifität des hSLC10A5-Ak (Sigma) am Zellmodell mittels Immunfluoreszenz

Mit stabil transfizierten HEK-SLC10A5-V5- und nativ SLC10A5 exprimierenden HepG2- sowie HEK293-Zellen als Negativkontrolle wurden Immunfluoreszenzuntersuchungen durchgeführt. Der hSLC10A5-Antikörper (Sigma) wurde als Primärantikörper in einer Verdünnung von 1 : 200 eingesetzt. Als Sekundärantikörper diente Cy3 Ziege-anti-Kaninchen (1 : 800). Die Zellkerne wurden mit DAPI/Methanol 1 : 5000 angefärbt (Blau). Die obere Reihe zeigt in Rot die Signale des hSLC10A5-Antikörpers (Sigma) und die untere Reihe das Überlagerungsbild mit den Zellkernen. Bei den HEK-SLC10A5-V5-Zellen enthält die Überlagerung zusätzlich Signale aus dem nicht abgebildeten Grünkanal, bei dem eine Markierung des SLC10A5-V5-Proteins mit Maus-V5 (1 : 5000) und AF488 Ziege-anti-Maus (1 : 800) erfolgte. Die gelbe Färbung stellt eine Überlagerung der Markierung in Rot und Grün dar. In den Teilbildern wird die Kontrolle ohne Primärantikörper dargestellt (Längenstandard 25 µm). Objektivvergrößerung: 40x

Für Untersuchungen im Western Blot an Zellproteinisolationen stellte sich der hSLC10A5-Antikörper ebenfalls als ungeeignet heraus. Obwohl genügend Mengen an Protein aufgetragen wurden, wie die Kontrolle mit dem GAPDH-Antikörper zeigte, markierte er weder in den HEK-SLC10A5-V5- noch in den HepG2-Zellen eine Bande. Das SLC10A5-Protein wurde jedoch gebildet und auf die Membran übertragen, da mit dem V5-Antikörper eine entsprechende Bande zwischen 50 und 60 kDA erkannt wurde, die der berechneten Größe des SLC10A5-V5 entsprach (Abb. 4.12).

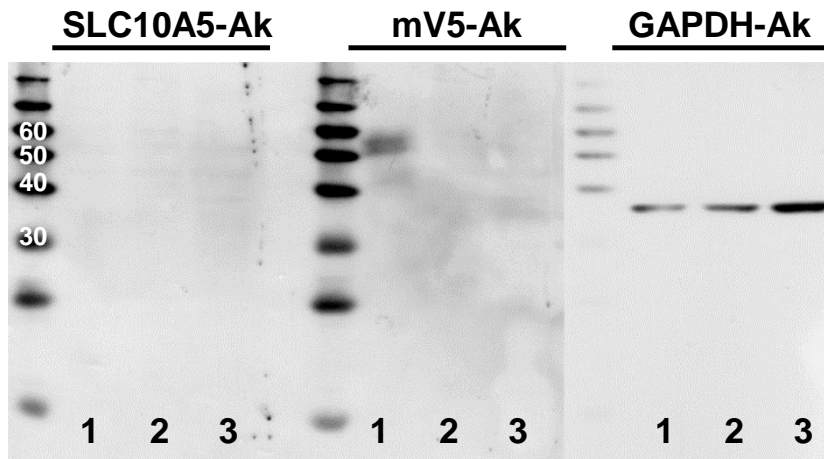


Abb. 4.12 Testung des hSLC10A5-Antikörpers (Sigma) auf seine Eignung für den Western Blot

Aus den stabil transfizierten HEK-SLC10A5-V5-Zellen (1), HEK293-Zellen als Negativkontrolle (2) und HepG2-Zellen (3) wurden Gesamtproteine isoliert, und es wurde jeweils 40 µg Protein unerhitzt aufgetragen. Als Primärantikörper wurden hSLC10A5 (Sigma) 1 : 300 und Maus-V5 1 : 5.000 eingesetzt und als Sekundärantikörper Rockland Ziege-anti-Maus 1 : 5.000 und Ziege-anti-Kaninchen 1 : 1.000. Als Kontrolle wurde die Membran gestript und mit dem GAPDH-Ak 1 : 25.000 und Kaninchen-anti Ziege 1 : 5.000 inkubiert.

In humanen Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten zeigte sich mit dem Antikörper keine Färbung in den vermuteten Zielzellen, sondern es konnte nur eine starke Anfärbung von immunkompetenten Zellen detektiert werden (Abb. 4.13). Im Blut des Herzens (A) färben sich Granulozyten (Pfeil) und ein Monozyt (offener Pfeil) an. In der Leber (B) färben sich nicht die Hepatozyten, sondern die in den Sinusoiden lokalisierten Makrophagen (Pfeilspitze).

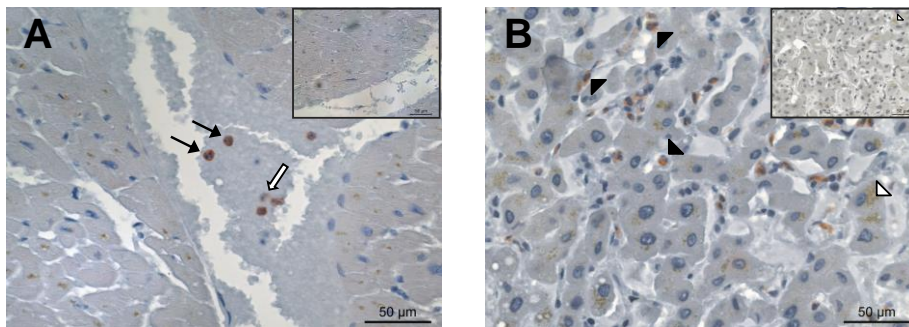


Abb. 4.13 Immunfärbung von humanem Gewebe (Paraffinschnitte) mit dem hSLC10A5-Antikörper (Sigma)

An humanem Gewebe (Human Tissue I und II (Biocat)) wurde eine immunhistologische Untersuchung mit dem hSLC10A5-Ak (Sigma) in einer Verdünnung von 1 : 20 durchgeführt sowie eine Negativkontrolle ohne Primärantikörper (kleines Bild) angefertigt. Im Herzen (A) zeigt sich eine Färbung von Granulozyten (Pfeil) und Monozyt (offener Pfeil). In der Leber (B) markierte der Antikörper die Makrophagen (Pfeilspitze). Rot-braun gefärbte Granula (offene Pfeilspitze) finden sich in Positiv- und Negativkontrolle. Objektivvergrößerung: 40x

Dies deckt sich mit den Daten aus *The human protein atlas* (Uhlen et al. 2015; www.proteinatlas.org), in dem dieser Antikörper getestet wurde und in immunhistologischen Schnitten eine Färbung bei Neutrophilen Granulozyten und hämatopoetischen Stammzellen sowie schwach in Epithelien hervorrief.

Da die angefärbten Zellpopulationen in absolutem Gegensatz zu den mRNA-Expressionsdaten stehen, kann davon ausgegangen werden, dass der SLC10A5-Antikörper in humanem Gewebe nicht das SLC10A5-Protein erkennt, sondern mit anderen Proteinen kreuzreagiert. Der hSLC10A5-Antikörper (Sigma) eignet sich somit nicht für den Proteinnachweis in Paraffinschnitten, sondern offensichtlich nur für Immunfluoreszenzuntersuchungen in SLC10A5-überexprimierenden Zellkulturen.

4.2.2 hSLC10A5-Antikörper (Aviva)

Ein weiterer kommerziell erhältlicher Antikörper stand von Aviva zur Verfügung. Dieser richtet sich gegen den vierten intrazellulären Loop bis zur neunten Transmembrandomäne des humanen SLC10A5-Proteins.

Mit diesem Antikörper konnte in keiner Anwendung eine spezifische Färbung erzielt werden. An den HEK-SLC10A5-V5-Zellen war nur eine unspezifische Fluoreszenz zu beobachten, obwohl der V5-Antikörper das Vorhandensein des SLC10A5-V5-Proteins anzeigte. Die HepG2-Zellen färbten sich nur in einer diffusen Hintergrundfluoreszenz (Abb. 4.14). In der Immunhistologie von humanen in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten zeigte sich überhaupt keine Farbreaktion mit diesem Antikörper (nicht gezeigt).

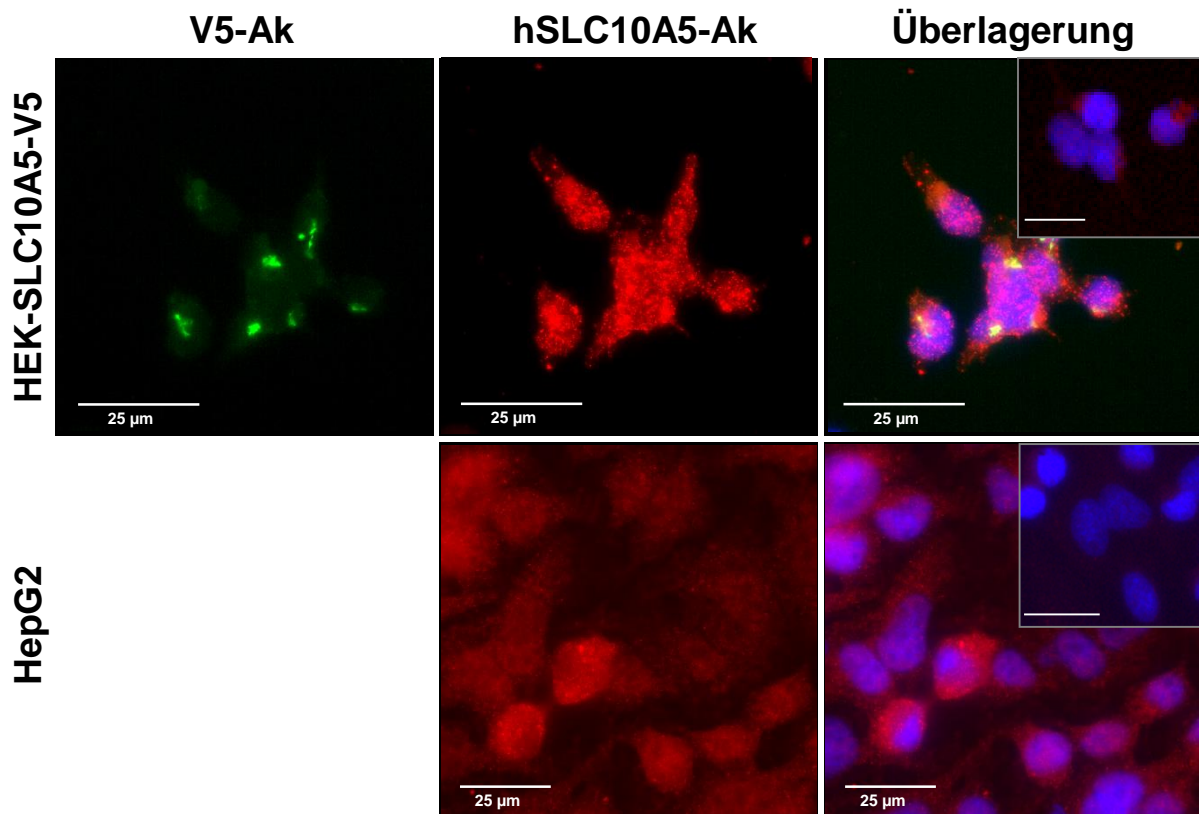


Abb. 4.14 Immunfluoreszenzuntersuchungen von stabilen HEK-SLC10A5-V5- und HepG2-Zellen mit dem hSLC10A5-Antikörper (Aviva)

Es wurde eine Immunfluoreszenz an stabil transfizierten HEK-SLC10A5-V5- und nativen HepG2-Zellen durchgeführt. Hierbei wurde der hSLC10A5-Ak (Aviva) (Rot) als Primärantikörper in einer Konzentration von 3,2 µg/ml eingesetzt und der Maus-V5-Ak (Grün) 1 : 5.000 verdünnt. Als Sekundärantikörper dienten AF488 Ziege-anti-Maus und Cy3 Ziege-anti-Kaninchen (jeweils 1 : 800). Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI/Methanol 1 : 5.000 (Blau). In den Teilbildern wird die Kontrolle ohne Primärantikörper dargestellt (Längsstandard 25 µm). Objektivvergrößerung: oben 63x, unten 40x

4.2.3 rSLC10A5-Antikörper (Eurogentec)

Zusätzlich zu den zwei kommerziell erhältlichen und gegen das humane SLC10A5-Protein gerichteten Antikörpern wurde speziell für die vorliegende Arbeit ein weiterer Antikörper bei der Firma Eurogentec in Auftrag gegeben. Dieser ist ein gegen den C-Terminus des Ratten-SLC10A5-Proteins gerichteter Anti-Peptid-Antikörper. Hierfür wurde ein KLH-gekoppeltes synthetisches Peptid (CKRPLLSTENEKAPLV) verwendet. Aus zwei Kaninchen wurden Antiseren gewonnen, von denen eines gegen das Immunisationspeptid aufgereinigt wurde. Somit standen Präimmun- und Immunsereum von zwei Kaninchen sowie ein affinitätsgereinigter Antikörper zur Verfügung.

Schaut man sich das Sequenzalignment des C-Terminus des SLC10A5-Proteins von Ratte, Maus und Mensch an, so fällt auf, dass zwischen Ratte und Maus 11 von 15 Aminosäuren gleich sind. Es ist somit möglich, dass der gegen das Rattenprotein erzeugte Antikörper auch das Mausprotein erkennt. Die humane Sequenz stimmt nur in 4 von 11 Aminosäuren mit der

Rattensequenz überein und weist in der Mitte zwei zusätzliche Phenylalanine auf (Abb. 4.15). Das humane Protein sollte demnach nicht erkannt werden.

Ratte	420	KRPL--LSTENEKAPLV
Maus	420	RRPS--LSTEYEKTPLV
Mensch	422	KRCIFFLQDKRKRNFLI

Abb. 4.15 Vergleich der SLC10A5-Proteinsequenz von Ratte, Maus und Mensch im Bereich des C-Terminus

Durch Kolokalisation von getaggen SLC10A5-Proteinen von Mensch, Ratte und Maus im Zellkulturmodell mit dem rSLC10A5-Antikörper und dem entsprechenden Tag-Antikörper sollte zunächst die Speziesreaktivität überprüft werden. Hierbei zeigte sich, dass der rSLC10A5-Antikörper in transient transfizierten HepG2-Zellen das Ratten-SLC10A5-V5-Fusionsprotein erkennt, wie an der Kolokalisation des Fluoreszenzsignals von V5-Tag- und rSLC10A5-Antikörper zu erkennen ist. Gegen die in den Zellen gebildeten SLC10A5-Proteine von Mensch und Maus zeigte der rSLC10A5-Antikörper keine Immunreaktivität, obwohl ihre ausreichende Expression anhand der Markierung mit dem V5-Antikörper nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.16).

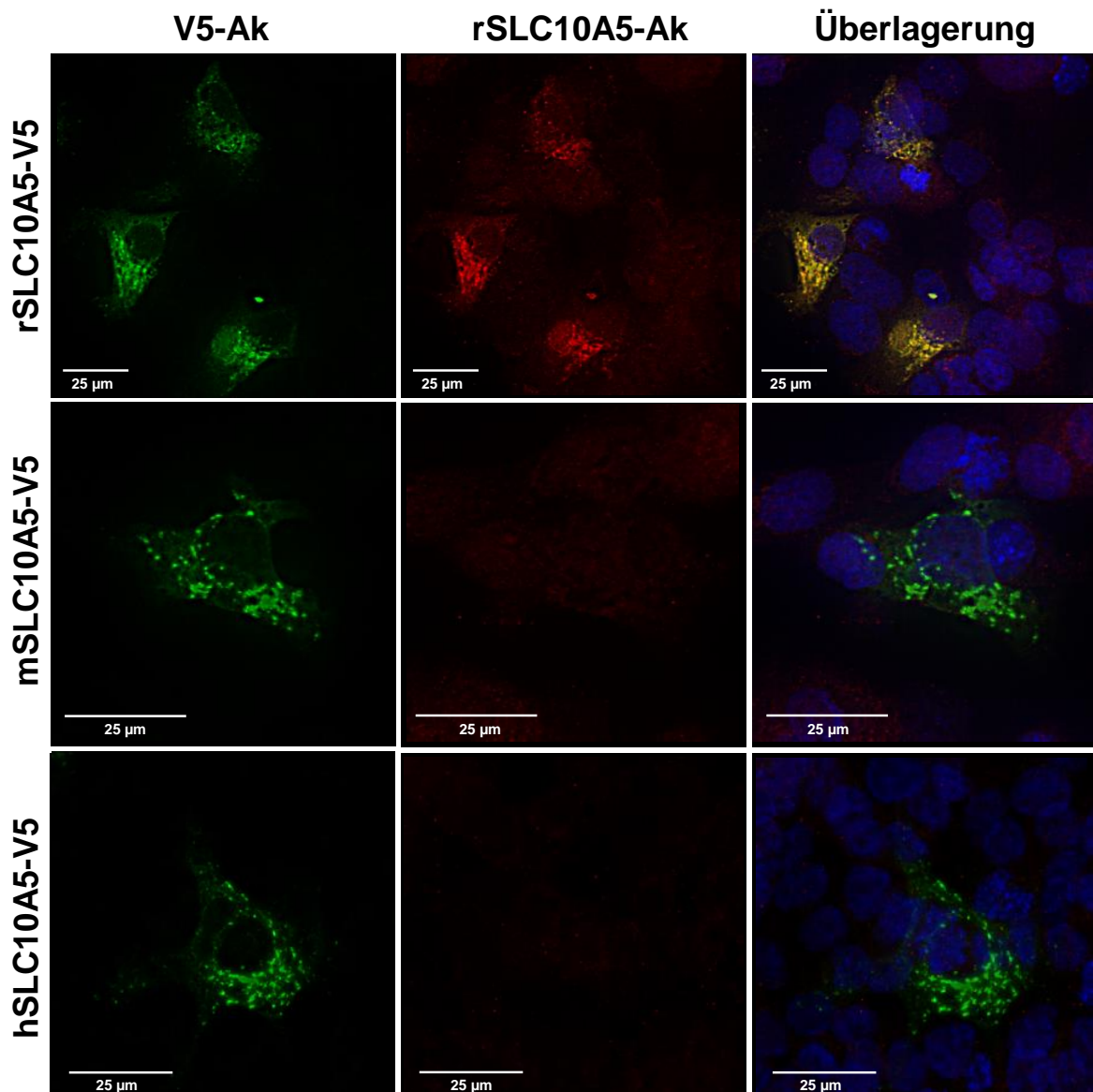


Abb. 4.16 Speziespezifität des rSLC10A5-Antikörpers

HepG2-Zellen wurden transient mit dem humanen SLC10A5-V5- (hSLC10A5), dem Maus- (mSlc10a5) oder Ratten-Slc10a5-V5-Plasmid (rSlc10a5) transfiziert. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mit den Primärantikörpern Maus-V5 (1 : 5.000) und rSLC10A5 (1 : 200) sowie den Sekundärantikörpern AF488 Ziege-anti-Maus und Cy3 Ziege-anti-Kaninchen (jeweils 1 : 800). Die Zellkerne wurden mit DAPI/PBS (1 : 5.000) gefärbt. Es wurden Z-Stapel-Aufnahmen angefertigt, die *Blind Deconvolution* wurde berechnet und die Maximum-Projektion der Ebenen abgebildet. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte Nachbarzellen. Objektivvergrößerung: 40x

4.2.3.1 Gewebeverteilung und intrazelluläre Lokalisation des Ratten-SLC10A5

In Western-Blot-Analysen zeigte sich analog zu den Immunfluoreszenzergebnissen, dass der Antikörper das humane SLC10A5-Protein (Gesamtlysat aus HEK-SLC10A5-GFP-Zellen) nicht detektieren konnte. Auch an Gesamtlysat aus transient rSlc10a5-V5-transfizierten Zellen konnte keine Bande gezeigt werden. Allerdings konnte das Fusionsprotein auch mit dem V5-Antikörper nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies konnte in der sehr gerin-

gen Transfektionseffizienz von maximal 5 % begründet liegen, sodass nicht genügend Protein vorhanden war. Somit konnte die Funktionalität des rSLC10A5-Antikörpers an transfizierten Zellen nicht abschließend geklärt werden.

Die Expression der *Slc10a5*-RNA in verschiedenen Rattengeweben war bereits bekannt (Fernandes et al. 2007). Aus Organen mit hoher Expression – wie Leber und Niere – sollte nun das Vorkommen des SLC10A5 auf Proteinebene untersucht werden.

In Western-Blot-Experimenten zeigte sich, dass der rSLC10A5-Antikörper ein zwischen 40 und 50 kDa großes Protein in Proteinpräparationen aus Rattenleber und -niere erkennt (errechnetes Molekulargewicht 48 kDa). Sowohl im Gesamtllysats als auch in der Membranfraktion (E2) der mit Proteo-Extrakt isolierten Proteine konnte eine starke Bande nachgewiesen werden, während in der löslichen Proteinfraktion (E1) keine Markierung erschien (Abb. 4.17 A). Das stimmt mit der Vorhersage überein, dass SLC10A5 aufgrund seiner Sequenz ein multitransmembranäres Protein darstellt.

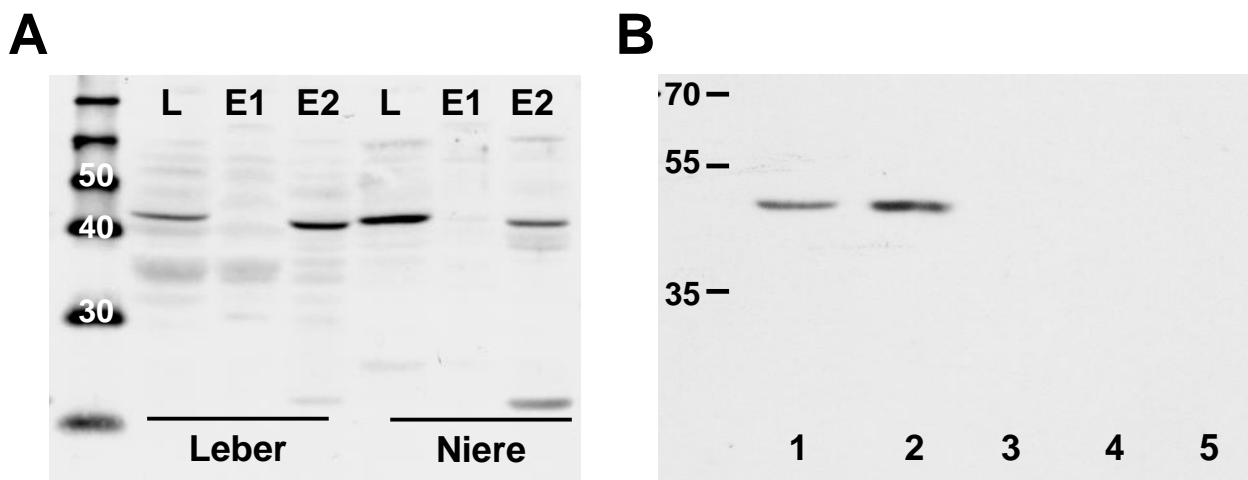


Abb. 4.17 Western-Blot-Analyse von Proteinpräparationen aus Rattengeweben mit dem rSLC10A5-Antikörper

Aus Geweben der Ratte wurden Proteine isoliert und 20 µl der Proteinlösung auf ein 12%iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Größenmarker diente Roti-Mark (A) oder der Proteinstandard SM1811 (B). Die Membran wurde mit dem rSLC10A5-Antikörper 1 : 500 und dann mit Esel-anti-Kaninchen HRP-gekoppelt 1 : 5.000 inkubiert.

(A) Gesamtllysats aus Leber und Niere (L) sowie mit Proteo Extract isolierte lösliche Proteine (E1) und Membranproteine (E2)

(B) Gesamtllysats aus Leber (1), Niere (2), Darm (3), Muskel (4) und Gehirn (5)

In weiteren Western-Blot-Analysen von Gesamtllysaten aus Rattengewebe konnte die zwischen 40 und 50 kDa liegende Bande bei Leber und Niere bestätigt werden. Dagegen ließ sich weder im Gewebelysats aus dem Darm noch aus dem Muskel oder dem Gehirn eine Bande detektieren (Abb. 4.17 B).

In immunhistologischen Untersuchungen an Rattengewebe konnte das SLC10A5-Protein in einer Vielzahl von Organen mit dem rSLC10A5-Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 4.18). Die mitgeführten Kontrollen ohne Primärantikörper waren alle ohne Signal, und auch die Peptidblockierung mit 100-fach molarem Überschuss Immunisierungspeptid reduzierte die Färbung auf nahezu null (Abb. 4.18 kleine Bilder oben rechts).

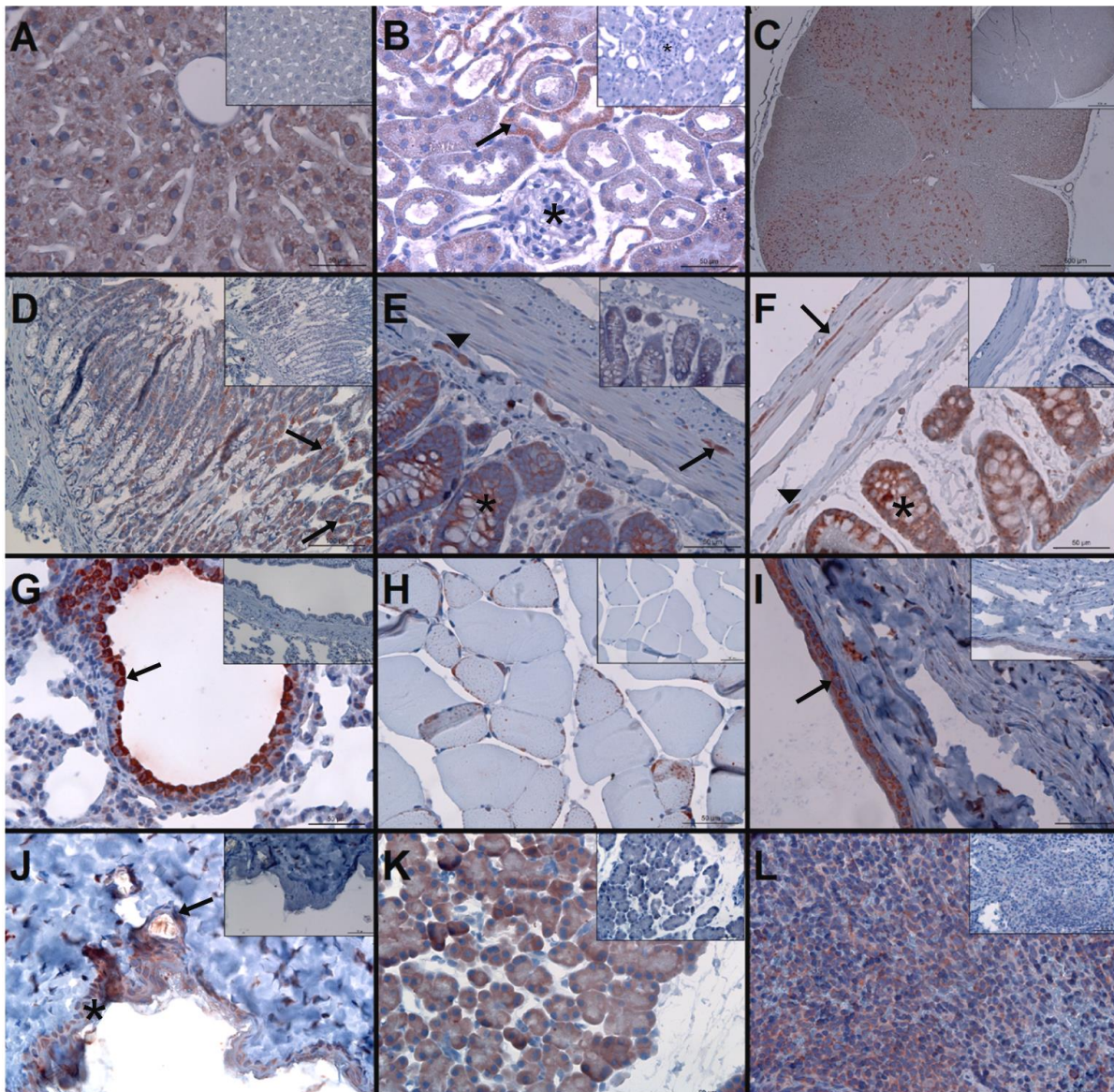


Abb. 4.18 Immunhistologie von Rattengewebe mit dem rSLC10A5-Antikörper (Eurogentec)

Von mit 4%igem PFA fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben einer männlichen Wistarrratte wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden mit dem rSLC10A5-Antikörper (Eurogentec) 1 : 100 inkubiert. Als Kontrolle diente eine Peptidblockierung mit 100-fach molarem Überschuss an Immunisierungspeptid (Teilbild oben rechts).

(A) Leber, (B) Niere (*Glomerulum, Pfeil distaler Tubulus), (C) Rückenmark, (D) Magen (Pfeil Belegzellen), (E) Dünndarm (* Mucosa, Pfeil: Plexus myentericus, Pfeilspitze: Plexus submucosus), (F) Dickdarm (* Mucosa, Pfeil: Plexus myentericus, Pfeilspitze: Plexus submucosus), (G) Lunge (Pfeil: Clara-Zellen), (H) quergestreifter Muskel, (I) Blase (Pfeil: Blasenepithel), (J) Haut (* Epidermis, Pfeil: Haarfollikel), (K) Pankreas, (L) Milz; Objektivvergrößerung: (C) 5x, (D) 20x, ansonsten 40x

Der rSLC10A5-Antikörper färbte in der Leber alle Hepatozyten an (Abb. 4.18 A). In der Niere markierte er sowohl die proximalen als auch die distalen Tubuli in der Rinde, reagierte aber auch mit den Podozyten in den Glomeruli (Abb. 4.18 B). In der grauen Substanz des Rückenmarks reagierte er mit den Zellkörpern der Nervenzellen (Abb. 4.18 C). Im Magen färbten sich die Drüsenzellen an und hierbei besonders die Belegzellen (Abb. 4.18 D). Auch in der nicht gezeigten *Pars nonglandularis* des Magens kam es zu einer Markierung des Epithels. Die Mukosazellen sowohl im Dün- als auch Dickdarm wurden stark markiert sowie die Nervenzellkörper im *Plexus myentericus* und *submucosus* (Abb. 4.18 E und F). In der Lunge waren vor allem die Clara-Zellen in den Bronchioli massiv angefärbt (Abb. 4.18 G). Am Rande der Muskelfaserbündel in der quergestreiften Skelettmuskulatur fanden sich auch markierte Strukturen (Abb. 4.18 H). Das Blasenepithel sowie einzelne Zellen, wahrscheinlich Nervenzellen, in der *Lamina propria* sowie der *Muscularis* reagierten mit dem rSLC10A5-Antikörper (Abb. 4.18 I). Auch das verhornende Plattenepithel der Haut wies Signale auf (Abb. 4.18 J). Im Pancreas war nur eine diffuse Färbung der Azinuszellen zu erkennen (Abb. 4.18 K). Die Milz zeigt eine schwache diffuse zytoplasmatische Färbung (Abb. 4.18 L).

4.3 Intrazelluläre Lokalisation von SLC10A5

Das Verteilungsmuster der angefärbten Zellen sowie die angedeutete intrazelluläre Lokalisation wiesen darauf hin, dass es sich um ein mitochondriales Protein handeln könnte. Aus diesem Grund wurden Doppelimmunmarkierungen mit dem rSLC10A5-Antikörper und dem gegen das mitochondriale Protein ATP-Synthetase gerichteten Antikörper an Cryoschnitten sowie Paraffinschnitten durchgeführt.

In Leber, Niere, Ileum, Magen, Rückenmark und Muskel konnte eine fast vollständige Überlagerung zwischen den Signalen der beiden Antikörper festgestellt werden. Dies deutete zunächst klar darauf hin, dass es sich bei SLC10A5 um ein mitochondriales Protein handelt. Lediglich in den Clara-Zellen in der Lunge stimmt das Verteilungsmuster nicht überein. Der rSLC10A5-Antikörper verursacht die stärkste Fluoreszenz apical in den Mucin speichernden Bereichen der apokrin sezernierenden Clara-Zellen, während die Mitochondrien eher basal lokalisiert sind (Abb. 4.19).

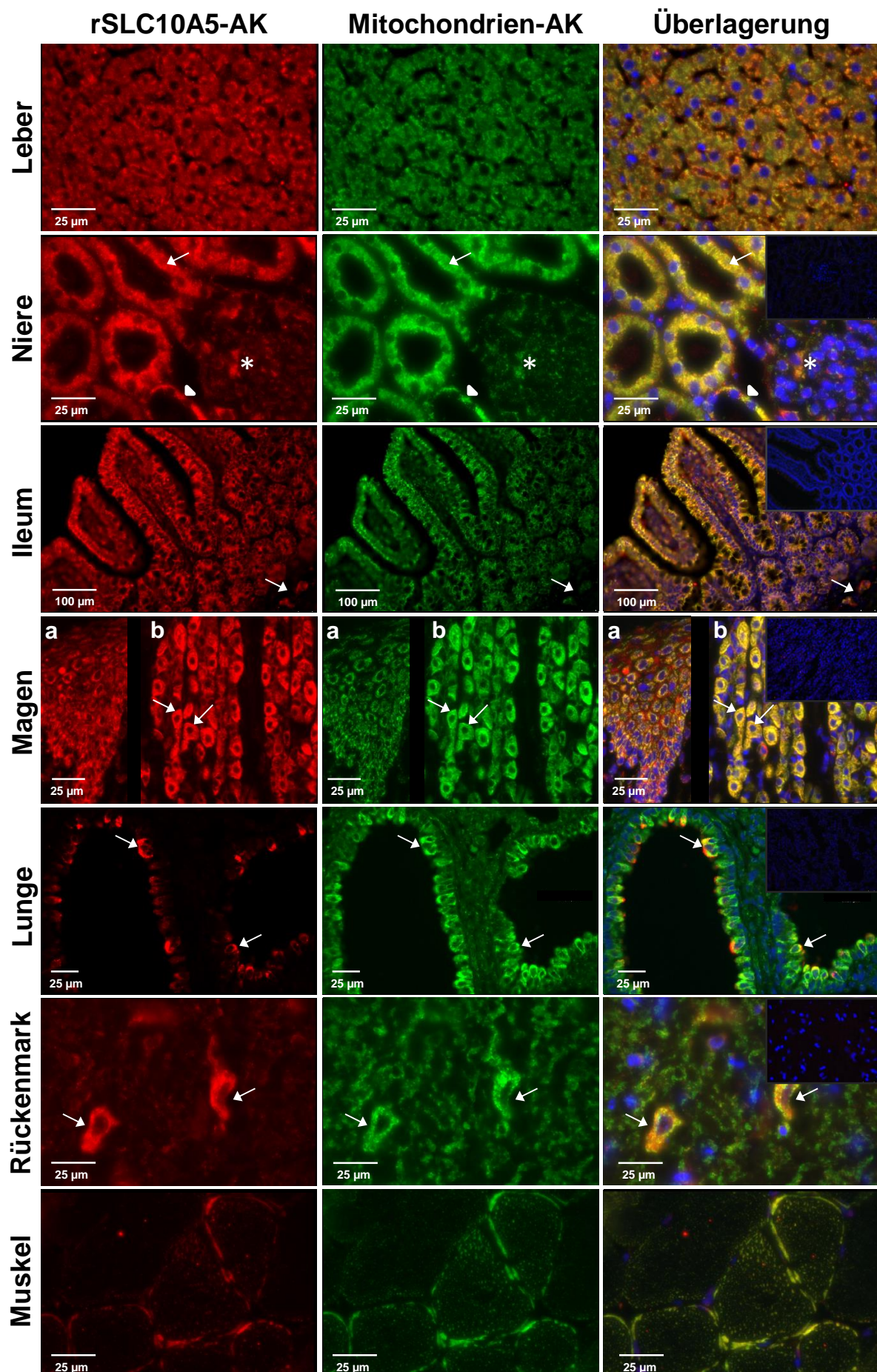


Abb. 4.19 Doppelimmunmarkierung von Rattengewebe mit dem rSLC10A5- und dem Mitochondrien-Antikörper

Sowohl von in Paraffin eingebetteten (Leber, Niere, Magen, Lunge, Muskel) als auch gefrorenen Geweben (Ileum, Rückenmark) wurden Schnitte angefertigt, diese analog zur klassischen Immunhistochemie aufgearbeitet und mit dem rSLC10A5-Antikörper (1 : 200) sowie dem Mitochondrien-Antikörper COX (1 : 500) markiert. Als Sekundärantikörper dienten AF488 Ziege-anti-Maus und Cy3 Ziege-anti-Kaninchen (jeweils 1 : 800). Als Kontrolle diente eine Peptidblockierung mit 100-fach molarem Überschuss an Immunisierungspeptid ohne Mitochondrienmarkierung (Teilbild oben rechts). Nierenrinde: Glomerulum (*), proximaler Tubulus (Pfeil), distaler Tubulus (Pfeilspitze); Ileum: *Plexus myentericus* (Pfeil); Magen: *Pars nonglandularis* (a), *Pars glandularis* (b), Belegzellen (Pfeil); Lunge: Clara-Zellen (Pfeil); Rückenmark, graue Substanz mit Nervenzellkörpern (Pfeil). Bei Muskel und Rückenmark wird die Maximum-Projektion aus einem Z-Stapel abgebildet. Objektivvergrößerung: 63x Leber, Niere, Rückenmark und Muskel; 40x Magen, Lunge; 20x Ileum

Trotz des nicht vom rSLC10A5-Antikörper erkannten Maus-SLC10A5-Proteins in den transient transfizierten Zellen wurde der Antikörper auch an Mausgewebe in Western Blot und Immunhistologie getestet.

Die Lokalisation in Mitochondrien sollte im Western Blot durch eine Aufreinigung von Mitochondrien durch Zentrifugation bestätigt werden. Hierbei wurden die Bestandteile der Zellen durch Zentrifugationsschritte mit steigender Geschwindigkeit separiert. In den zuerst abzentrifugierten Pellets (P1, P2) sollten sich Bestandteile der Zellmembran und der Kerne befinden, der nächste Pelletierschritt sollte Mitochondrien anreichern (M) und der Überstand kleinere Organellen und lösliche Proteine beinhalten (Ü).

In aus Rattenleberzellen isolierten Fraktionen fanden sich bis auf den Überstand in allen Fraktionen mitochondriale Anteile, wie die Markierung mit dem Antikörper gegen das mitochondriale Protein Cytochromoxidase (COXIV) zeigte (Abb. 4.20 A). Die Anreicherung der Mitochondrien in Fraktion M gelang nicht. Analog zum COXIV-Antikörper markierte der rSLC10A5-Antikörper eine 40 bis 50 kDa große Bande mit einer Intensität von P1 > P2 > M und fast keiner Detektion im Überstand. Somit war mit diesem Protokoll keine ausreichende Aufreinigung von Mitochondrien gelungen, aber der Hinweis für die Lokalisation von rSLC10A5 in Mitochondrien bestärkt wurden. Auch mit einem anderen Protokoll zur Organellenaufreinigung angelehnt an (Wieckowski et al. 2009), welches weitere Ultrazentrifugationsschritte beinhaltet, konnte keine ausreichende Mitochondrienanreicherung in nur einer Phase beobachtet werden, jedoch wieder eine ähnlich starke Bandenmarkierung durch den rSLC10A5- und den CoxIV-Antikörper (Daten nicht gezeigt).

Das gleiche Protokoll wurde auch zur Aufreinigung von Fraktionen aus Mausgewebe verwendet. Hierfür wurde aus den *Slc10a5*-Wildtyp- und Knockout-Mäusen jeweils Leber, Niere und Milz verwendet. Als stärkste Bande zeigte sich in der Pellet- und Mitochondrienfraktion eine ~22 kDa-Bande in Leber und Niere. Gleichzeitig färbte sich dort eine ~42 kDa-Bande an.

Der Überstand wies mit ~38 kDa und ~60 kDa ein anderes Bandenmuster auf. In den Isolationen aus der Milz färbten sich keine Banden an, obwohl die Ponceau-Färbung nach dem Blotting für alle aufgetragenen Proben Proteinbanden zeigte (Abb. 4.20 B). Da sowohl die Knock-out-Maus als auch die Wildtyp-Maus dasselbe Bandenmuster aufwiesen, kann davon ausgegangen werden, dass das detektierte Protein nicht dem Maus-SLC10A5 entspricht. Schließlich lässt die Ähnlichkeit des Bandenmusters zwischen Ratte und Maus mit dem rSLC10A5-Antikörper Zweifel aufkommen, ob es sich bei den in der Ratte detektierten Banden um eine Immunreaktivität gegen das SLC10A5-Protein handelt. Vielmehr kann eine unspezifische Färbung eines bisher nicht identifizierten Proteins angenommen werden.

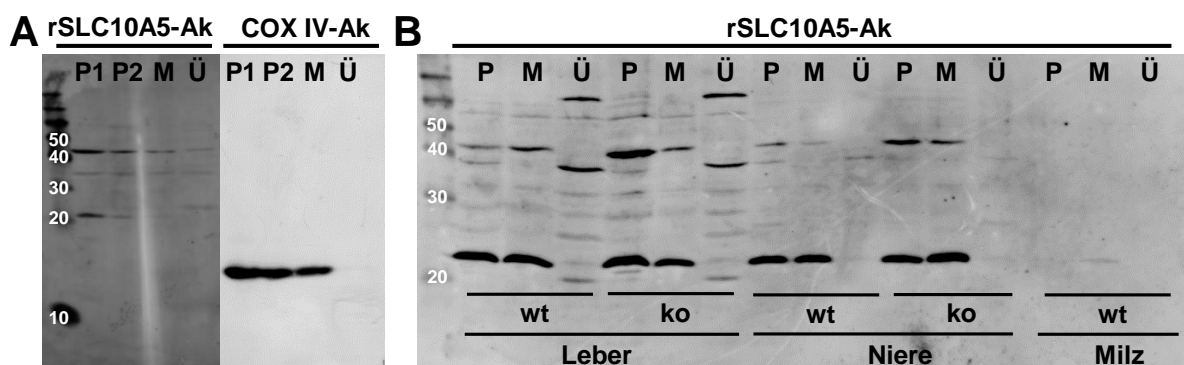


Abb. 4.20 Western-Blot-Analyse von Mitochondrienaufreinigungen aus Rattenleber- (A) und Mäusegewebe (B)

Die Zellen wurden im Potter-Elvehjem-PTFE-Homogenisator aufgeschlossen, Zellkerne, Zellmembran abzentrifugiert (P), Mitochondrien pelletiert (M) und der Überstand aufbewahrt (Ü). Davon wurden je 20 µg auf ein 12%iges Acrylamidgel aufgetragen.

(A) Bei den aus Rattenleberzellen isolierten Fraktionen wurde als Primärantikörper der rSLC10A5-Antikörper (1 : 500) und als Mitochondrienmarker der COX IV-Antikörper (1 : 2.000) mit Ziege-anti-Maus (1 : 5.000) bzw. Ziege-anti-Kaninchen (1 : 10.000) Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper eingesetzt. (B) Die aus Leber, Niere und Milz von *Slc10a5*-Knockout- und Wildtyp-Mäusen isolierten Fraktionen wurden vergleichend aufgetragen und mit dem rSLC10A5-Antikörper (1 : 500) und dem Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen Sekundärantikörper (1 : 10.000) markiert.

Immunhistochemische Färbungen mit dem rSLC10A5-Antikörper von in Paraffin eingebettetem Mäusegewebe wiesen ein ähnliches Färbemuster wie die untersuchten Rattengewebe auf. Auch hier waren in der Leber die Hepatozyten, in der Niere die Tubulizellen, im Dünndarm die Mucosa und der *Plexus submucosus* und im Magen die Drüsenzellen gefärbt (Abb. 4.21). Allerdings führte die Peptidblockierung hier zum Teil nicht wie in den Untersuchungen am Rattengewebe zu einer absoluten Aufhebung der Antikörperbindung (siehe Abb. 4.18). Durch die aus Arbeitsschutzgründen verwendete phenolfreie Glycerolgelatine kam es leider bei ausgeprägter Farbreaktion zu einem stärkeren Ausfärben in das Eindeckelmedium.

Da sich die Gewebe von *Slc10a5*-Knockout-Maus und Wildtyp-Maus gleichermaßen anfärben, kann nicht von einer spezifischen Reaktion mit dem SLC10A5-Protein in der Immunhistologie ausgegangen werden.

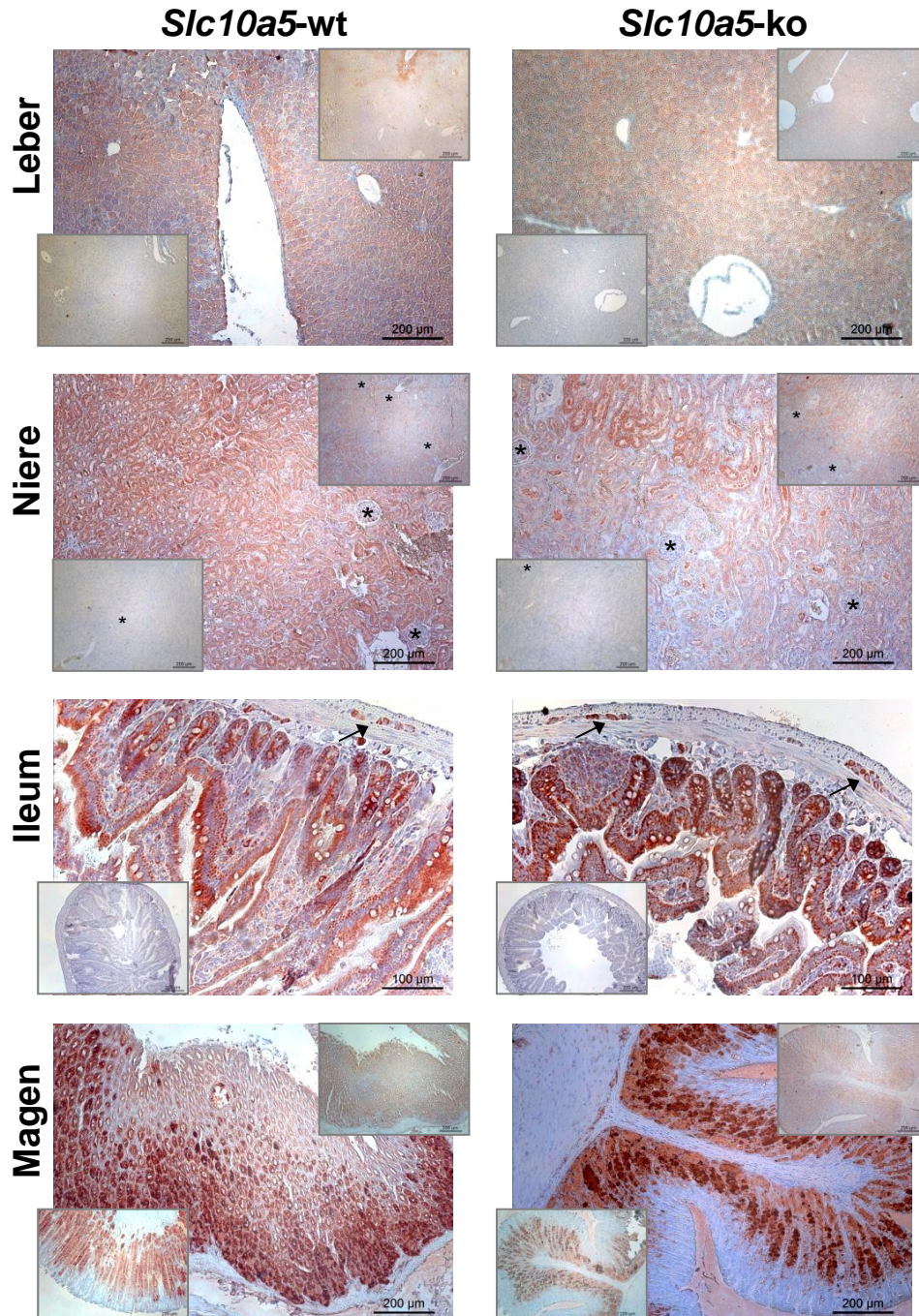


Abb. 4.21 Immunhistologie von Geweben der *Slc10a5*-Knockout- und Wildtyp-Mäuse mit dem rSLC10A5-Antikörper

Die mit 4%igem PFA immersionsfixierten Gewebe wurden in Paraffin eingebettet und 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Der rSLC10A5-Antikörper wurde 1 : 200 eingesetzt. Eine Negativkontrolle ohne Primärantikörper (kleines Bild unten links) und eine Peptidblockierung mit 100-fach molarem Überschuss des Immunisierungspeptids (kleines Bild oben rechts) wurden mitgeführt. Glomeruli in der Niere (*), *Plexus myentericus* im Ileum (Pfeile); Objektivvergrößerung: Ileum 20x, ansonsten 10x

4.4 Funktion

4.4.1 Transporterexpression bei Gallengangsligatur und Lipopolysaccharid-Behandlung

Untersuchungen zur Genexpression von *Slc10a1* (*Ntcp*) und *Abcb11* (*Bsep*) in der Rattenleber bei durch Gallengangsligatur induzierter Cholestase und Behandlung mit Lipopolysaccharid zeigten eine Herunterregulation von *Slc10a1* (Diss. Schumacher 2011). Am gleichen Material wurde die Expression von *Slc10a5* mittels quantitativer Real-Time-PCR untersucht und die *Slc10a1*- und *Abcb11*-Expression zur Kontrolle mitbestimmt. Hierbei zeigte sich, dass drei Tage nach Gallengangsligatur die *Slc10a5*-Expression genau wie die des *Slc10a1* auf ungefähr ein Fünftel der Expression der Kontrolltiere abfiel. 24 Stunden nach Behandlung mit Lipopolysaccharid verringerte sich die Expression aller drei Gene signifikant (Abb. 4.22). Somit konnte bestätigt werden, dass *Slc10a5* bei Cholestase und Lipopolysaccharidbehandlung analog zu *Slc10a1* reguliert wird.

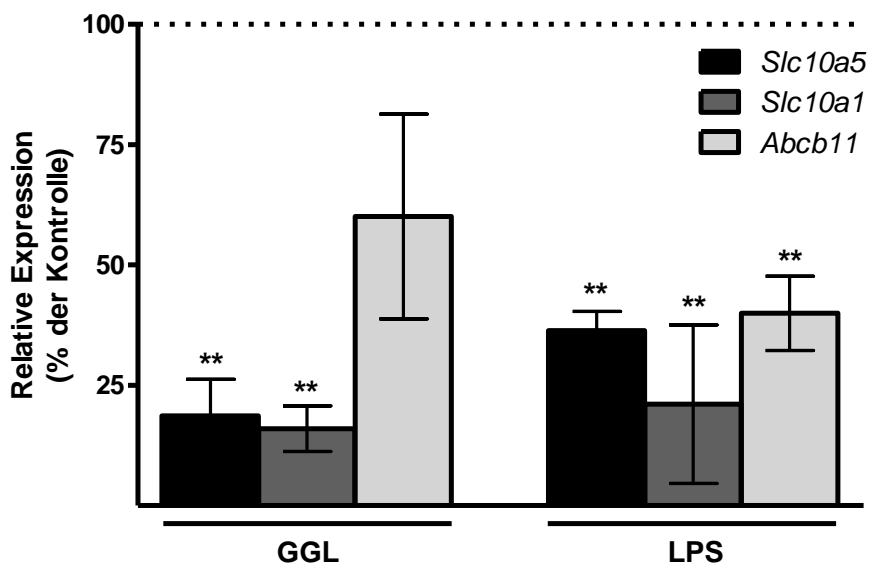


Abb. 4.22 mRNA-Expression von *Slc10a5*, *Slc10a1* und *Abcb11* nach Gallengangsligatur und Lipopolysaccharidbehandlung bei der Ratte

Aus Leberproben von Ratten drei Tage nach Gallengangsligatur (GGL) ($n = 3$) oder 24 Stunden nach Behandlung mit 4 mg/kg KGW Lipopolysaccharid (LPS) ($n = 4$) wurde RNA isoliert, revers transkribiert und in die quantitative Real-Time-PCR eingesetzt. Mittels ΔC_T -Methode wurde auf den Housekeeper *Actb* normalisiert und die relative Expression als $2^{-\Delta\Delta C_T}$ auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrollgruppe bezogen. Dargestellt ist die Expression in % der Kontrollgruppe als $MW \pm SD$. ** signifikanter Unterschied zur Kontrolle im zweiseitigen t-Test, $p < 0,01$

4.5 Transportmessungen im Zellkulturmodell

Die Transportaktivität von SLC10A5 wurde im Rahmen einer früheren Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen bereits grob an *Xenopus laevis* Oozyten mit Cholat, Taurocholat, Estron-3-Sulfat und DHEAS untersucht (Fernandes et al. 2007). Hierbei konnte kein Transport dieser Substanzen über die Plasmamembran festgestellt werden. Da die Verwandtschaft zu NTCP und ASBT aber eine Beteiligung am Gallensäuretransport vermuten ließ, wurde an den HEK-SLC10A5-V5-Zellen überprüft, ob diese eine Transportaktivität für [³H]-markierte Gallensäuren aufweisen.

4.5.1 Transportmessung an intakten HEK 293-Zellen

Obwohl in den Immunfluoreszenzuntersuchungen keine Lokalisation des SLC10A5-Proteins in der Zellmembran nachgewiesen werden konnte, wurde die Aufnahme von Gallensäuren über die Plasmamembran gemessen, um nicht eine schwache Sortierung des SLC10A5-Proteins in die Zellmembran und eine dort auftretende Transportaktivität zu übersehen. Gemessen werden sollte hier die natriumabhängige Aufnahme in die Zellen durch ein Verwenden von natriumhaltigem und natriumfreiem Transportpuffer. Als Positivkontrolle dienten HEK-NTCP-Flag-Zellen. Rein deskriptiv betrachtet zeigten diese für alle getesteten Gallensäuren eine Natrium-abhängige Aufnahme, während die HEK-SLC10A5-V5-Zellen auf dem Niveau der Kontrollzellen blieben. Auf die Darstellung der statistischen Auswertung wird hier verzichtet, da zwar die Positivkontrolle NTCP einen signifikanten natriumabhängigen Transport zeigte, aber auch für die Kontrollzellen Signifikanzen erreicht wurden und somit kein Bezug zur biologischen Relevanz bestand.

Mit dem gewählten Modell wurde demnach für SLC10A5 kein Transport für die unkonjugierten Gallensäuren Cholat, Deoxycholat, Ursodeoxycholat und Sarcosincholat (Abb. 4.23 A bis D), die Taurin-konjugierten Taurocholat, Taurodeoxycholat, Tauroursodeoxycholat und Taurochenodeoxycholat (E bis H) und die Glycin-konjugierten Glycodeoxycholat, Glycoursodeoxycholat und Glycochenodeoxycholat (I bis K) nachgewiesen.

Ergebnisse

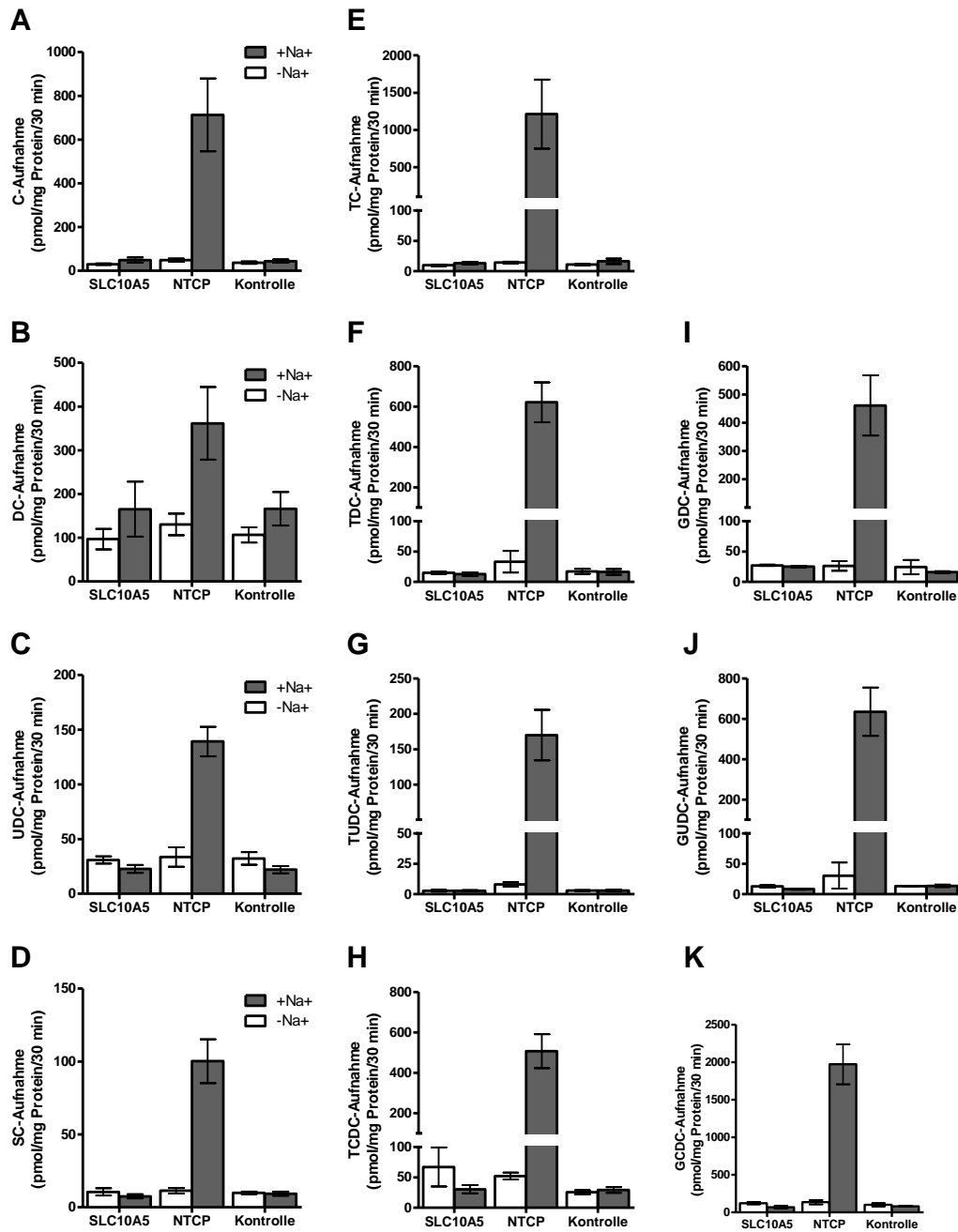


Abb. 4.23 Gallensäureaufnahme in intakte HEK-SLC10A5-V5-, HEK-NTCP-Flag- und HEK293-Kontroll-Zellen

Untersucht wurde die Aufnahme von Gallensäuren in stabil transfizierten HEK293-SLC10A5-V5-, HEK293-NTCP-Flag- und untransfizierten HEK293-Kontrollzellen in natriumhaltigem (+Na⁺) und als Kontrolle in natriumfreiem Transportpuffer (–Na⁺). Der Aufnahmeversuch wurde über 30 min mit den unkonjugierten Gallensäuren Cholat, Deoxycholat, Ursodeoxycholat und Sarcosincholat (**A bis D**), den Taurin-konjugierten Taurocholat, Taurodeoxycholat, Tauroursodeoxycholat und Taurochenodeoxycholat (**E bis H**) und den Glycin-konjugierten Glycodeoxycholat, Glycoursodeoxycholat und Glycochenodeoxycholat (**I bis K**) durchgeführt. Alle Gallensäuren wurden mit einer Konzentration von 1 μ M und 0,5 % Heißanteil eingesetzt, bis auf Sarcosincholat, das 1 μ M mit 100 % Heißanteil gemessen wurde. Dargestellt sind MW \pm SD einer Messung in Vierfachbestimmung.

4.5.2 Transportmessung an Digitonin-permeabilisierten HEK293-Zellen

Da die Immunfluoreszenzuntersuchungen an der HEK-SLC10A5-V5-Zelllinie eine Lokalisation des SLC10A5-Proteins im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat zeigten, wurde auch mit Digitonin-permeabilisierten Zellen gearbeitet. Durch das Digitonin wird die Zellmembran durchlässig, während die Organellenmembranen intakt bleiben. Somit sollten Substrate, welche in den Überstand gegeben werden, einen direkten Zugang zu den intrazellulären Kompartimenten haben, an welchen dann eine Aufnahme der Substanzen untersucht werden konnte. Die Messungen wurden bei 37 °C durchgeführt sowie bei 4 °C als Kontrolle. Zusätzlich zu den HEK-SLC10A5-V5-Zellen wurden HEK-NTCP-Flag- und untransfizierte HEK293-Zellen als Kontrollen mitgeführt. Die Messungen wurden mit den unkonjugierten Gallensäuren Cholat, Deoxycholot, Ursodeoxycholot und Sarcosincholat (Abb. 4.24 A bis D), den Taurin-konjugierten Taurocholot, Taurodeoxycholot, Tauroursodeoxycholot und Taurochenodeoxycholot (Abb. 4.24 E bis H) und den Glycin-konjugierten Glycodeoxycholot, Glycoursodeoxycholot und Glycochenodeoxycholot (Abb. 4.24 I bis K) durchgeführt. Es konnte für keine dieser Gallensäuren ein relevanter Unterschied zwischen den HEK-SLC10A5-Zellen und den Kontrollzellen detektiert werden, der auf einen spezifischen Transport hingedeutet hätte.

Für sämtliche getesteten Gallensäuren bis auf Ursodeoxycholot akkumulierte bei allen drei gemessenen Zelllinien mehr Radioaktivität bei 37 °C als bei 4 °C. Dies ist vermutlich auf eine höhere Penetration der Gallensäuren in die permeabilisierten Zellen bei 37 °C zurückzuführen. Unerklärlicherweise verhielt es sich bei Ursodeoxycholot jedoch genau andersherum. Generell zeigten die Werte der HEK-SLC10A5-V5-Zellen keine Unterschiede zu den HEK293-Kontrollzellen. Deswegen wird für keines der getesteten Substrate ein Transport über SLC10A5 angenommen. Auf die Darstellung der statistischen Auswertung wird aus den in Kapitel 4.5.1 genannten Gründen verzichtet, zumal sich zusätzlich eine Auswertung der 37-°C-Werte bezogen auf die 4-°C-Kontrolle nicht als sinnvoll erwies.

Taurocholot, Taurodeoxycholot, Glycodeoxycholot und Taurochenodeoxycholot wurden in die HEK-NTCP-Flag-Zellen bei 37 °C wesentlich mehr aufgenommen als in die HEK293-Kontrollzellen. Dies könnte an einer Bindung dieser Gallensäuren an den NTCP liegen. Oder zusätzlich zur Diffusion erfolgt ein Transport über die Plasmamembran via NTCP an nicht vollständig permeabilisierten Zellen, ermöglicht durch nicht vollständig ausgewaschene Natriumreste.

Ergebnisse

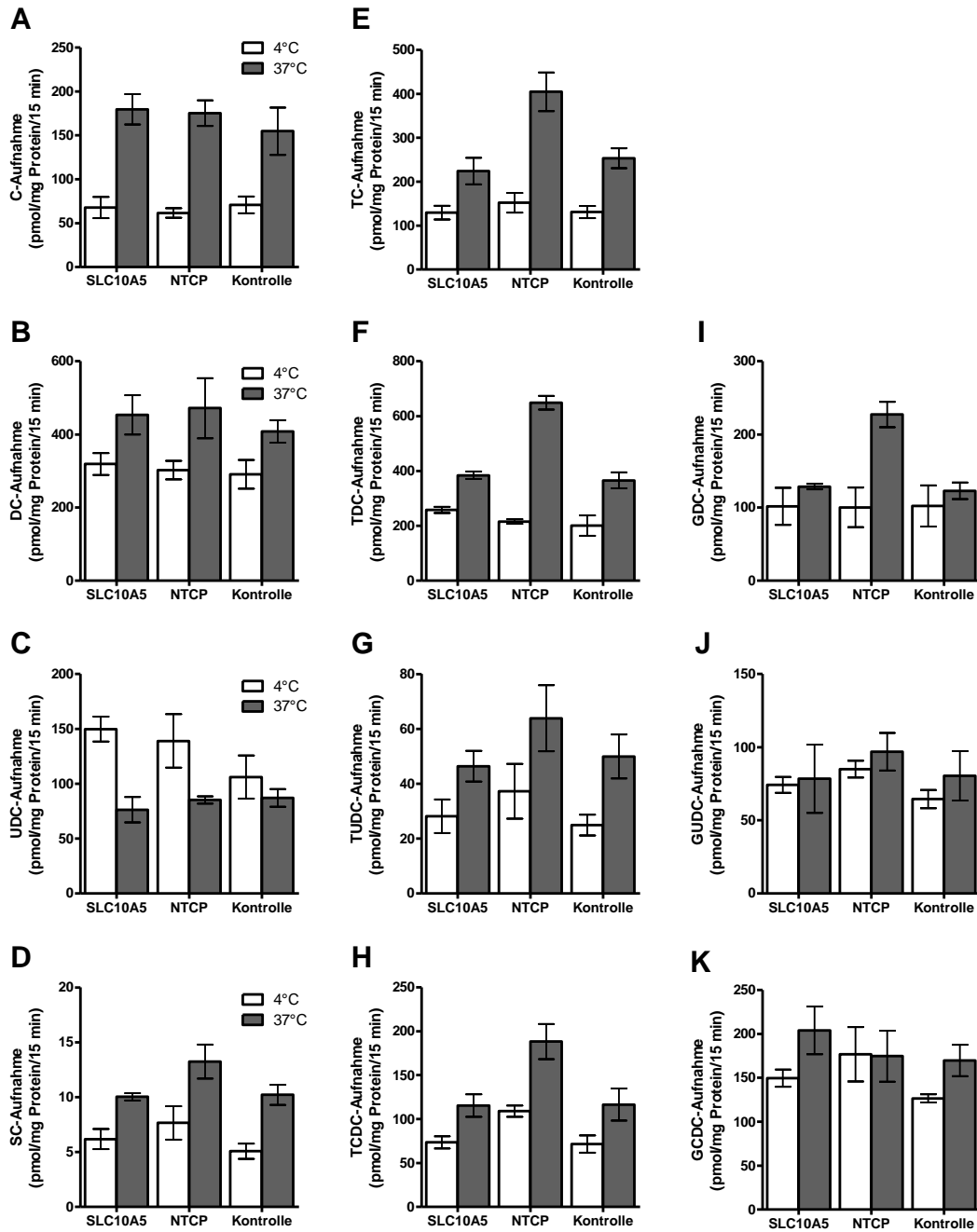


Abb. 4.24 Gallensäureaufnahme in Digitonin-permeabilisierten HEK-SLC10A5-V5-, HEK-NTCP-Flag- und HEK293-Kontroll-Zellen

Untersucht wurde die Aufnahme von Gallensäuren in stabil transfizierten HEK-SLC10A5-V5-, HEK-NTCP-Flag-Zellen und untransfizierten HEK293-Kontrollzellen bei 37 °C und bei 4 °C. An den mit Digitonin permeabilisierten Zellen wurden Aufnahmeversuche mit den unkonjugierten Gallensäuren Cholat, Deoxycholat, Ursodeoxycholat und Sarcosincholat (A bis D), den Taurin-konjugierten Taurocholat, Taurodeoxycholat, Tauroursodeoxycholat und Taurochenodeoxycholat (E bis H) und den Glycin-konjugierten Glycodeoxycholat, Glycoursodeoxycholat und Glycochenodeoxycholat (I bis K) durchgeführt. Alle Gallensäuren wurden mit einer Konzentration von 5 µM und 0,5 % Heißanteil eingesetzt bis auf Sarcosincholat, das mit 100 nM und 100 % Heißanteil gemessen wurde. Dargestellt sind MW ± SD einer repräsentativen Messung in Vierfachbestimmung.

4.5.3 Fluoreszierende Gallensäuren

Um einen möglichen intrazellulären Transport von Gallensäuren über SLC10A5 zu untersuchen, wurde eine weitere Strategie gewählt. Hierfür wurden die unkonjugierte Gallensäure Cholsäure sowie die konjugierte Taurocholsäure verwendet, an die das grün-fluoreszierende NBD gekoppelt ist. Mit diesen fluoreszierenden Gallensäuren sollte das intrazelluläre Verteilungsmuster sichtbar gemacht werden. In einem Vorversuch zeigte sich, dass nur Zellen, die NTCP in ihrer Zellmembran lokalisiert haben, die beiden Gallensäuren aufnehmen können. Deswegen wurden die stabil transfizierten HEK-SLC10A5-V5-Zellen und zum Vergleich nicht SLC10A5-exprimierende HEK293-Zellen mit NTCP-V5 transient übertransfiziert. Die fluoreszierenden Gallensäuren wurden innerhalb kurzer Zeit in die Zellen aufgenommen und verblieben über den Beobachtungszeitraum vom Zeitpunkt 10 min bis 41 h mit gleichbleibender Fluoreszenz intrazellulär detektierbar. Die Verteilung intrazellulär erschien besonders für die Taurocholsäure diffus, während die Cholsäure zum Teil auch in vesikulären Strukturen akkumulierte. Allerdings hatte die Anwesenheit von SLC10A5 keinen offensichtlichen Einfluss auf das intrazelluläre Verteilungsmuster der Gallensäuren, wie in Abb. 4.25 exemplarisch für den Zeitpunkt 17 h dargestellt ist.

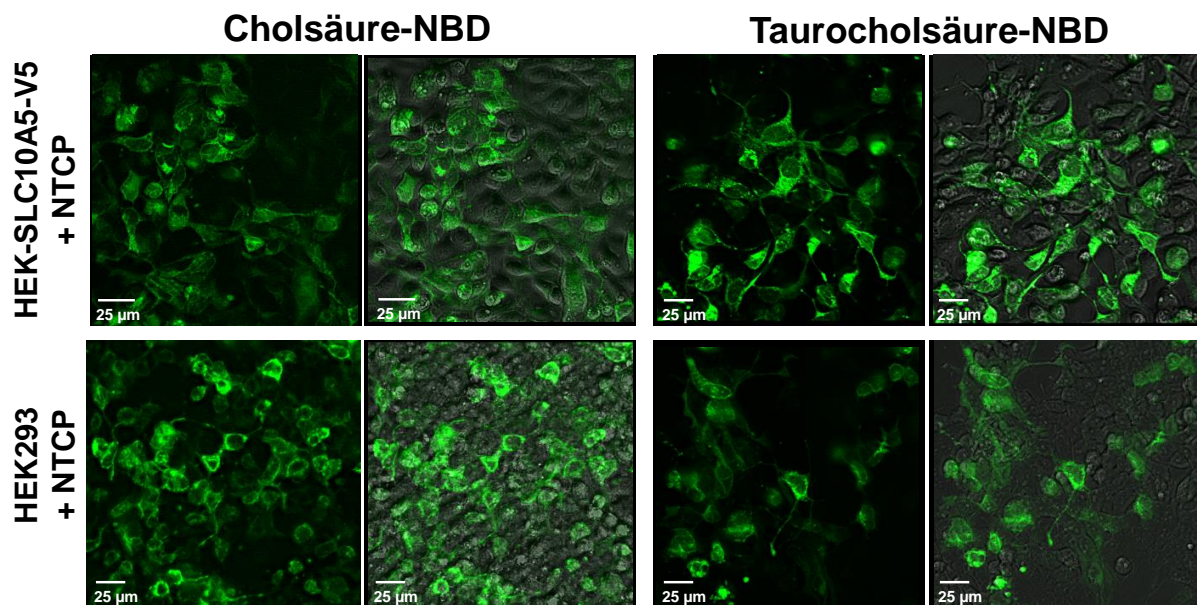


Abb. 4.25 Intrazelluläres Verteilungsmuster von Fluoreszenz-markierten Gallensäuren

Stabil transfizierte HEK-SLC10A5-V5- sowie HEK293-Zellen als Kontrolle wurden transient mit NTCP-V5 transfiziert. Die in 100%igem Ethanol vorgelösten Gallensäuren Cholsäure-NBD und Taurocholsäure-NBD wurden dem HEK-Zellkulturmedium zu einer Endkonzentration von 1 μ M (Ethanol 1 %) zugegeben, 10 min inkubiert und mit PBS gewaschen. Für den weiteren Verlauf wurde wieder Medium dazugegeben und die Platte im CO₂-Inkubator bebrütet. Nach 10, 30, 60, 120 min, 17 und 41 h wurden Aufnahmen mit dem inversen Fluoreszenzmikroskop im GFP-Kanal und mit Phasenkontrast angefertigt. Abgebildet ist der Zeitpunkt 17 h in 40x Objektivvergrößerung.

4.6 Die *Slc10a5*-Knockout-Maus

Genotypisierungs-PCR

Die Funktion des SLC10A5-Proteins aufzuklären stellte das Hauptziel der vorliegenden Arbeit dar. Da im Zellkulturmodell die molekulare Funktion von SLC10A5 nicht aufgeklärt werden konnte, wurde ein Knockout-Maus-Modell etabliert, um die physiologische Funktion des Proteins im Gesamtorganismus zu untersuchen. Die hier verwendete *Slc10a5*-Knockout-Maus ist durch einen vollständigen Knockout der SLC10A5-proteincodierenden Sequenz gekennzeichnet. Die *Slc10a5*-Knockout-Maus wurde als zwei heterozygote F1-Hybrid-Zuchtpärchen bezogen.

Die aus den Schwanzspitzenbiopsien dieser Mäuse gewonnene DNA wurde zur Etablierung der Genotypisierungs-PCR verwendet, da der Genotyp dieser Tiere definitiv bekannt war. In dieser Genotypisierungs-PCR kann bei den *Slc10a5*-Wildtyp-Mäusen mit einem Vorwärtsprimer, der in der nichtcodierenden DNA vor dem *Slc10a5*-Gen sitzt, und einem Rückwärtsprimer am Anfang des *Slc10a5*-Exons ein 335 Basenpaare langes PCR-Produkt erzeugt werden. Bei den *Slc10a5*-Knockout-Mäusen wird ein Vorwärtsprimer verwendet, der am Ende der LacZ-Neomycinresistenzkassette bindet, und ein Rückwärtsprimer, der im 3'-UTR des *Slc10a5*-Gens liegt. Hierdurch wird ein 363 Basenpaare langes PCR-Produkt gebildet. Wie erwartet, kann bei den heterozygoten Mäusen sowohl mit der Wildtyp- als auch der Knockout-PCR eine Bande in der entsprechenden Größe erzeugt werden (Abb. 4.26).

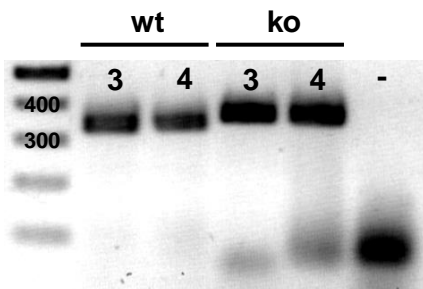


Abb. 4.26 Etablierung der *Slc10a5*-Genotypisierungs-PCR

Die von TIGM bezogenen männlichen heterozygoten F1-Hybriden (Maus Nr. 3 und 4), wurden zur Etablierung der Genotypisierungs-PCR verwendet. Dabei wurde in einem Wildtyp-PCR-Ansatz (wt) ein 335-bp-Fragment aus dem Wildtypallel amplifiziert und in einem Knockout-PCR-Ansatz (ko) 363 bp des Knockoutallels.

Die Genotypen der Mäuse, die mit der Genotypisierungs-PCR bestimmt wurden, konnten zusätzlich auch mit weiteren *Slc10a5*-spezifischen Primern auf DNA- und cDNA-Ebene bestätigt werden. Von einer homozygoten Knockout-Maus, einer heterozygoten und einer Wildtyp-Maus, die mit der Genotypisierungs-PCR identifiziert wurden, wurde Leber-RNA in cDNA umgeschrieben. Sowohl aus der genomischen DNA als auch aus der cDNA von Wild-

typ und heterozygoter Maus konnte ein 180 bp langes PCR-Fragment amplifiziert werden, welches bei der Knockout-Maus fehlt (Abb. 4.27). Somit kann sowohl aus genomischer DNA als auch cDNA der Genotyp der Mäuse sicher bestimmt werden.

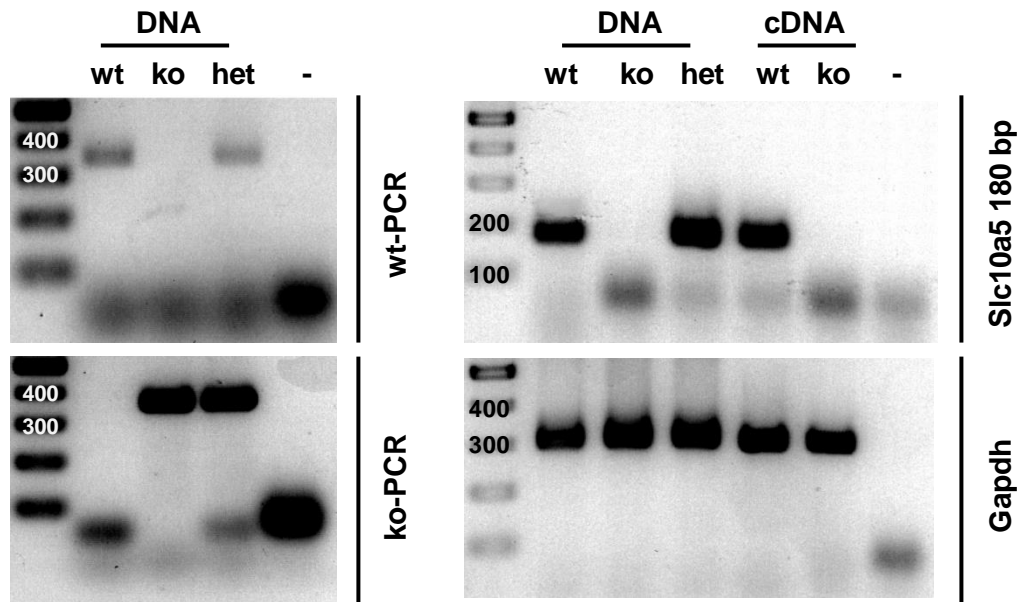


Abb. 4.27 Nachweis des Genotyps der *Slc10a5*-Knockout-Mauslinie mittels PCR auf DNA- und RNA-Ebene

Zur Bestätigung der Ergebnisse der Genotypisierungs-PCR wurde exemplarisch mit der DNA einer *Slc10a5*-Wildtyp- (wt), einer Knockout- (ko) und einer heterozygoten Maus (het) die Genotypisierungs-PCR wiederholt. Dabei amplifiziert die wt-PCR ein 335 bp langes Fragment aus dem Wildtypallel und die ko-PCR ein 363 bp langes des Knockoutallels. In der *Slc10a5*-180-bp-PCR wurde ein 180 bp langes Stück aus dem Leserahmen des *Slc10a5* amplifiziert. Dieser Nachweis wurde auch mit cDNA erbracht, um das Vorhandensein von *Slc10a5*-Transkript in der Wildtyp-Maus und das Fehlen in der Knockout-Maus zu bestätigen. In allen Proben war amplifizierbare DNA vorhanden, wie die Kontrolle mit Gapdh zeigt.

Zuchtdaten

Die *Slc10a5*-Knockout-Mäuse zeigten bei Anpaarung von heterozygoten Weibchen mit heterozygoten Männchen (het x het) eine Verteilung der Geschlechter und der Genotypen wie theoretisch vorhergesagt. Es wurden in sieben Würfen 49 % Weibchen und 51 % Männchen geboren (Tab. 4.2). Die Genotypen entsprachen mit 22 % Wildtyp, 56 % Heterozygot und 18 % Knockout dem erwarteten Verhältnis von 1 : 2 : 1 (ko : het : wt). Die als ? eingeordneten Tiere wiesen in der Genotypisierungs-PCR eine schwache Wildtyp- zusätzlich zur Knockout-Bande auf. Dieses Problem wurde wahrscheinlich durch eine Kontamination der Ohrstanzen ausgelöst. Aufgrund dieser Daten kann davon ausgegangen werden, dass es nicht zu einer erhöhten pränatalen Sterblichkeit der Knockout-Mäuse kommt.

Tab. 4.2 Verteilung der Genotypen bei het x het-Anpaarung

Genotyp	total	Weibchen	Männchen
Wildtyp	15 (22 %)	5 (7 %)	10 (15 %)
Heterozygot	38 (56 %)	22 (32 %)	16 (24 %)
Knockout	12 (18 %)	5 (7 %)	7 (10 %)
?	3 (4%)	1 (2 %)	2 (3 %)
Gesamt	68 (100 %)	33 (49 %)	35 (51 %)

Das Fehlen des SLC10A5 führte zu keiner Beeinträchtigung der Fertilität der Mäuse. In den meisten Verpaarungen wurden zwei Weibchen mit einem Männchen vergesellschaftet, sodass die durchschnittliche Wurfgröße je Maus nicht ermittelt werden konnte. Jedoch zeigten die Mäuse bei het x ko-Verpaarung mit einer durchschnittlichen Wurfgröße von 11,3 sogar mehr Nachkommen als bei het x het mit 7,4 Nachkommen. An 1 : 1-Verpaarungen het x het konnte bei sieben Würfen eine durchschnittliche Wurfgröße von 7,9 gesehen werden, wohingegen bei den C57BL/6NTac-Mäusen durchschnittlich 6,0 Tiere je Wurf geboren werden (Persönliche Mitteilung Anne Edenro, Taconic Dänemark). Zieht man in Betracht, dass die *Slc10a5*-Knockout-Mäuse einen Heterosis-Effekt durch ihren anfänglichen Hybridstatus zeigen und die C57BL/6NTac-Mäuse durch die Inzuchtdepression geringere Wurfgrößen aufweisen, liegen die Wurfgrößen von Anpaarungen mit den Knockout-Mäusen oder heterozygoten Mäusen im Rahmen des Normalen.

4.7 Cholsäurefütterung der *Slc10a5*-Knockout-Maus

Um die Funktion des SLC10A5 *in vivo* aufzuklären, sollte zunächst das Gallensäureprofil der *Slc10a5*-Knockout-Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus untersucht werden. Da die Knockout-Mäuse bislang keine phänotypischen Auffälligkeiten zeigten, sollte die Fütterung mit 0,5 % Cholsäure eventuell vorhandene Kompensationsmechanismen aushebeln, um so einen Einblick in den Gallensäurestoffwechsel der *Slc10a5*-Knockout-Mauslinie zu erlangen.

4.7.1 Gewicht

Vor Beginn der einwöchigen Fütterungsphase wurden alle Mäuse gewogen und auf Auffälligkeiten untersucht. Sowohl die *Slc10a5*-Knockout-Mäuse (B6.129S5-*Slc10a5*^{tm1Lex}) als auch die Wildtyp-Kontrolltiere (C57BL/6NTac) zeigten keine offensichtlichen gesundheitlichen Beeinträchtigungen. Dennoch waren die Knockout-Mäuse (ko) trotz gleichen Alters signifikant leichter als die Wildtypiere (wt) am Tag des Versuchsbeginns (Abb. 4.28 A). Dieser

Gewichtsunterschied blieb über die einwöchige Fütterungsperiode erhalten. Die mit der Standardhaltungsdiät gefütterten Tiere (ko/wt Kontrolle) nahmen in diesem Zeitraum etwas zu und die mit 0,5 % Cholsäure angereichertem Futter versorgten Tiere (ko/wt Cholsäure) verloren moderat Gewicht (Abb. 4.28 B)

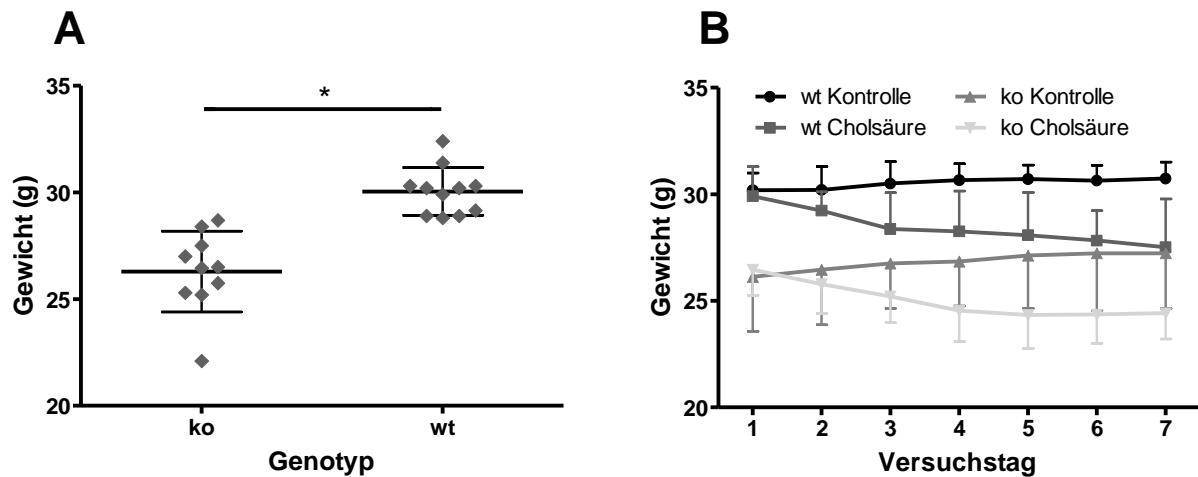


Abb. 4.28 Anfangsgewichte und Gewichtsentwicklung der *Slc10a5*-Knockout- und Wildtyp-Mäuse unter Cholsäurefütterung

Während der einwöchigen Fütterungsphase mit 0,5 % Cholsäure-haltigem Futter (Cholsäure) oder der Standardhaltungsdiät (Kontrolle) wurden die Mäuse täglich nachmittags gewogen.

(A) Die Anfangsgewichte von *Slc10a5*-Knockout- (ko) und Wildtypmäusen (wt) vor Versuchsbeginn unterschieden sich signifikant (* $p < 0,0001$ zweiseitiger t-Test).

ko n = 10, wt n = 11

(B) Die Gewichtsentwicklung während der Fütterungsphase wird dargestellt.

wt Kontrolle n = 5, wt Cholsäure n = 6, ko Kontrolle/ko Cholsäure n = 5

4.7.2 Klinische Veränderungen

Zusätzlich zum Gewichtsverlust zeigte sich bei den mit Cholsäure gefütterten Mäusen beider Genotypen nach drei bis fünf Tagen eine etwas weichere, aber noch geformte Konsistenz des Kots, die sich nach ein bis zwei Tagen wieder normalisierte. Davon waren 60 % der Knock-out-Mäuse und 83 % der Wildtyp-Mäuse betroffen.

Bei der Katheterisierung der Gallenblase fielen neben einer vergrößerten stark gefüllten Gallenblase bei den mit Cholsäure gefütterten Mäusen Veränderungen am Dünndarm auf. *Post mortem* stellten sich diese Veränderungen als ödematös-gallertiger und geröteter Dünndarm heraus (Abb. 4.29). Bei den Knockout-Mäusen waren diese Veränderungen stärker ausgeprägt als bei den Wildtypen, bei denen nur der proximale Anteil betroffen war. Der Dickdarm war bei beiden Genotypen nicht verändert.

Bei den Knockout-Mäusen hatte es außerdem den Anschein, dass sie weniger stark ausgeprägte Fettdepots im Bauchraum aufweisen, was das geringere Gewicht begründen könnte.

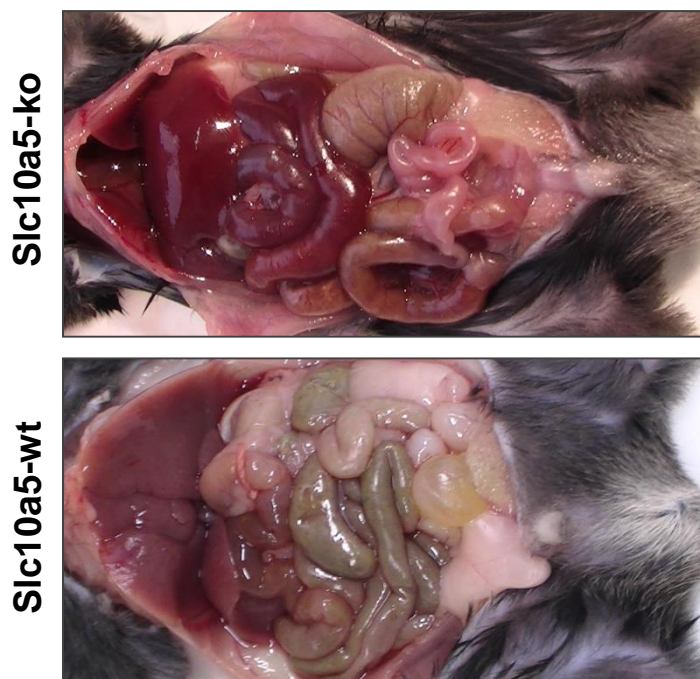


Abb. 4.29 Vergleich der Darmveränderungen der *Slc10a5*-Knockout- und Wildtyp-Maus nach 0,5 % Cholsäurefütterung

Nach einwöchiger Fütterung von 0,5 % Cholsäure-haltigem Futter wurden nach der Gallenblasenkatheterisierung *post mortem* die Veränderungen am Bauchsitus der Mäuse festgehalten.

Diese Unterschiede konnten auch anhand der Organgewichte nachvollzogen werden. Während die prozentualen Organgewichte generell weder durch den Genotyp noch die Fütterung beeinflusst wurden, kam es zu einer signifikanten Gewichtszunahme des Darmkonvoluts durch die Cholsäurefütterung, die bei den Knockout-Mäusen stärker ausfiel, ohne statistische Signifikanz zu erreichen (Abb. 4.30).

Der Füllungsgrad des Magens und des Darmtrakts wies adspektorisch keine Besonderheiten auf, die auf eine Veränderung der Futteraufnahme hingewiesen hätten.

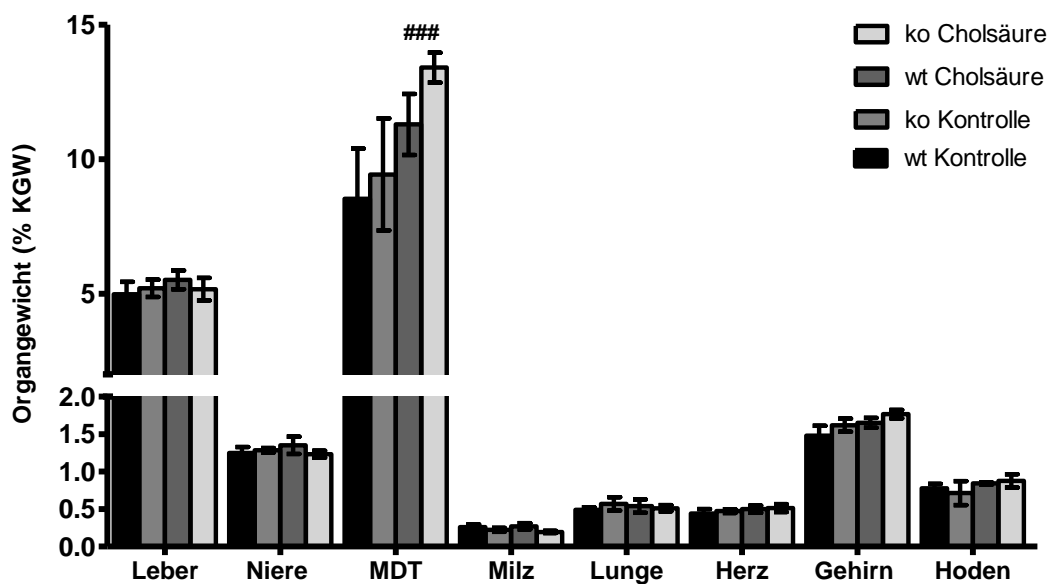


Abb. 4.30 Prozentuale Organgewichte der *Slc10a5*-Knockout-Mäuse und Wildtyp-Mäuse nach Cholsäurefütterung

Die von den *Slc10a5*-Knockout- oder Wildtyp-Mäusen nach einer Woche Fütterung mit entweder Standardhaltungsdiät (Kontrolle) oder 0,5 % Cholsäure-haltigem Futter (Cholsäure) direkt nach dem Tod entnommenen Organe wurden gewogen und prozentual auf das Gesamtkörpergewicht bezogen. Zugrunde liegt eine Gruppengröße von $n = 4$ (ko Cholsäure, ko Kontrolle und wt Kontrolle) bzw. $n = 5$ in der wt-Cholsäure-Gruppe. Dargestellt ist der $MW \pm SD$. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller Anova mit Bonferroni-Post-Test.

signifikanter Einfluss des Faktors Fütterung (### $p < 0,001$)

Da diese Veränderungen makroskopisch den Anschein einer Entzündung hatten, wurde in einer histologischen Untersuchung der Organe mit Hämatoxilin-Eosin-Färbung ein besonderes Augenmerk auf den Darm gelegt. Während bei Mäusen beider Genotypen bei Kontrollfütterung außer autolytischen Prozessen keine Veränderungen gefunden wurden, zeigte sich bei der mit Cholsäure gefütterten Wildtyp-Maus eine leichte Hyperämie in Form von sichtbaren Gefäßen in den Zotten (Abb. 4.31 Pfeil) und einer gut gefüllten Gekrösevene (Pfeilspitze). Der Dünndarm der mit Cholsäure gefütterten Knockout-Maus zeigte außer dem größeren Darmdurchmesser Erythrozytenansammlungen (Pfeile) im Darmlumen und in den Zotten sowie geweitete Gefäße in der Submukosa. Das Gewebe der Submukosa war zudem sehr locker, was auf ein Ödem hinweisen kann. In keinem Anschnitt des Darms konnten vermehrt Entzündungszellen nachgewiesen werden.

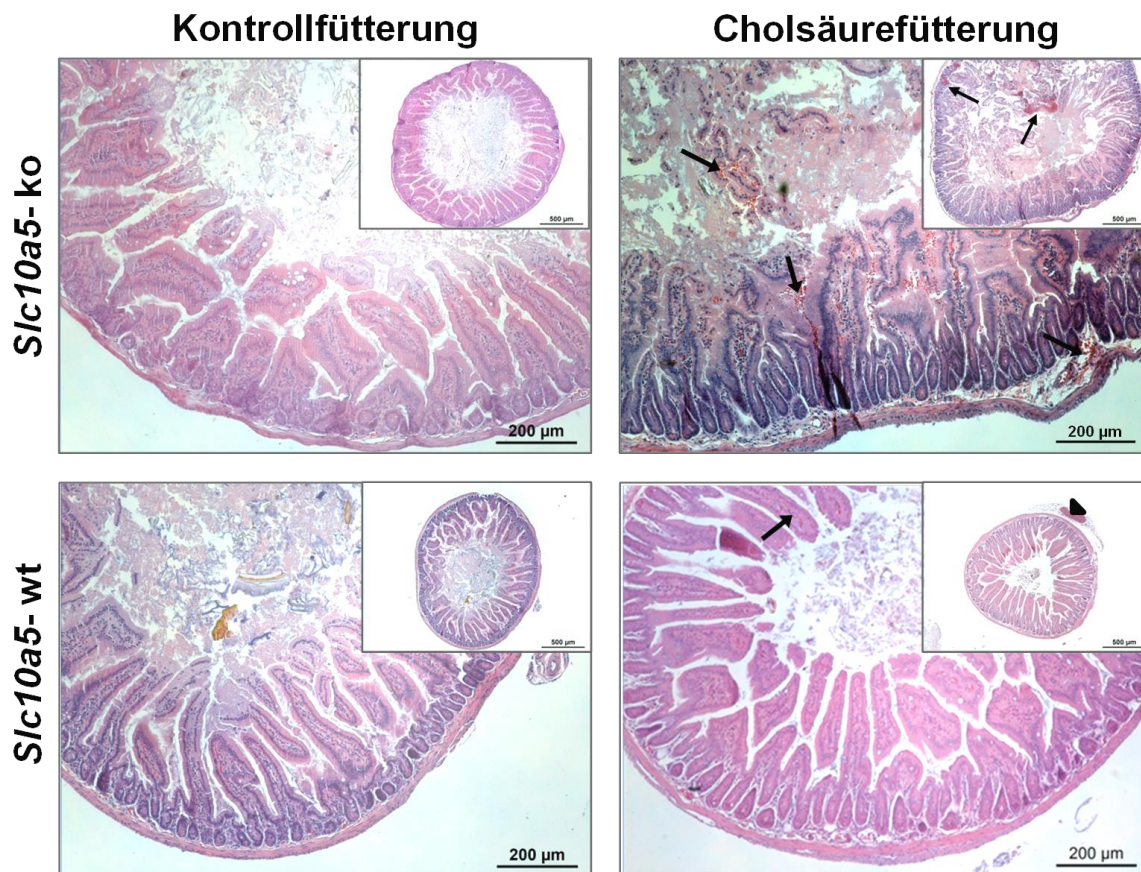


Abb. 4.31 H&E-Färbung von Dünndarmschnitten der *Slc10a5*-Knockout- im Vergleich zur Wildtyp-Maus nach Kontroll- oder Cholsäurefütterung

Von 4 % PFA fixiertem und in Paraffin eingebettetem Lebergewebe wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt, die mit Hämatoxilin-Eosin gefärbt wurden. Repräsentative Dünndarmschnitte von *Slc10a5*-Knockout-Mäusen sowie der Wildtypkontrolltiere unter Kontrollfütterbedingungen und nach einer Woche 0,5 % Cholsäurefutter sind abgebildet.

Erythrozyten-reiche Areale (Pfeile), Gekrösevene (Pfeilspitze); Objektivergrößerung: Hauptbild 10x, kleines Teilbild 5x

Die Lebern waren bei allen Versuchstieren makroskopisch unauffällig und unterschieden sich nur durch die deutlich gefüllten Gallenblasen der mit Cholsäure gefütterten Tiere. In der Histologie der Leber zeigte sich, dass es bei den mit Cholsäure gefütterten Mäusen zu einer vermehrten Füllung der Gallekanälchen gekommen sein musste, was durch Lücken zwischen den Hepatozyten angezeigt wurde (Abb. 4.32). Dies korrelierte mit der gesteigerten ausgeschiedenen Gesamtgallenmenge während der Gallenblasenkatheterisierung.

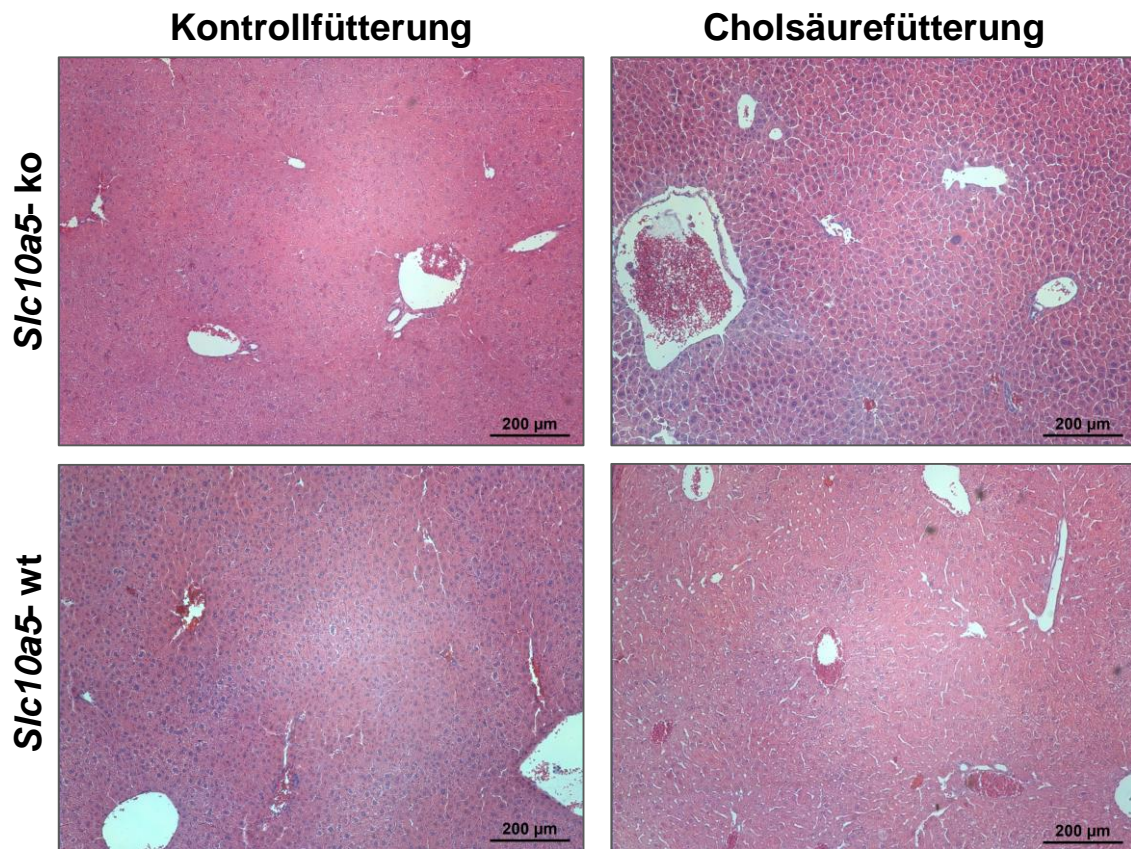


Abb. 4.32 H&E-Färbung von Leberschnitten der *Slc10a5*-Knockout- im Vergleich zur Wildtyp-Maus nach Kontroll- oder Cholsäurefütterung

Von mit 4%igen PFA fixiertem und in Paraffin eingebettetem Lebergewebe wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt, die mit Hämatoxilin-Eosin gefärbt wurden. Repräsentative Leberschnitte von *Slc10a5*-Knockout-Mäusen sowie der Wildtypkontrolltiere unter Kontrollfutterbedingungen und nach einer Woche 0,5 % Cholsäurefutter sind abgebildet. Objektivvergrößerung: 10x

4.7.3 Gallemenge

Die von den *Slc10a5*-Knockout-Mäusen binnen 30 min durch den Gallenblasenkatheter abgeführte Gallemenge betrug 106 ± 22 mg und unterschied sich nicht von der Ausscheidung der Wildtypkontrolle mit 108 ± 30 mg. Durch die Gabe der 0,5 % Cholsäure-haltigen Diät erhöhte sich die Menge signifikant auf das Dreifache mit 365 ± 139 mg bei der Knockout- und 351 ± 101 mg bei der Wildtyp-Maus. Der Genotyp der Mäuse hatte auf die Gallemenge jedoch keinen Einfluss (Abb. 4.33).

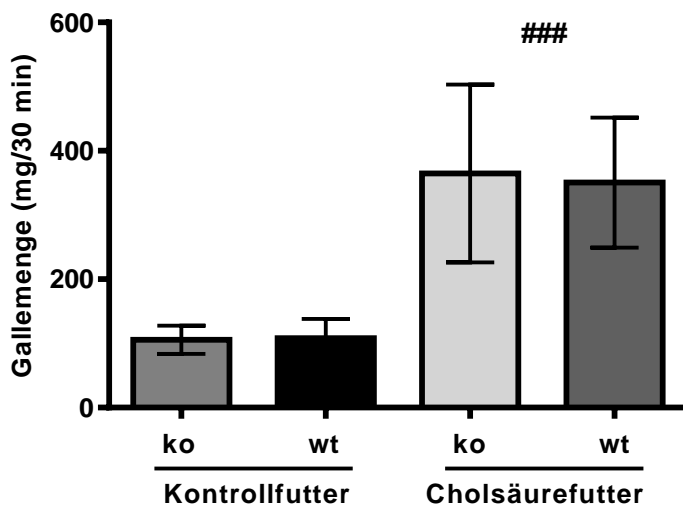


Abb. 4.33 Gallemenge der *Slc10a5*-Knockout- im Vergleich zur Wildtyp-Maus nach Kontroll- oder Cholsäurefütterung

Von den *Slc10a5*- Knockout- (ko) oder Wildtyp-Mäusen (wt) nach einer Woche Fütterung mit entweder Standardhaltungsdiät (Kontrolle) oder 0,5 % Cholsäure-haltigem Futter wurde über die Katheterisierung der Gallenblase in einem Zeitraum von 30 min Galle gesammelt und diese ausgewogen. Dargestellt sind die Daten als MW \pm SD mit einer Gruppengröße von n = 4 (ko Cholsäure, ko Kontrolle und wt Kontrolle) bzw. n = 2 bei der wt-Cholsäure-Gruppe. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller Anova mit Bonferroni-Post-Test.

signifikanter Einfluss des Faktors Fütterung (### p < 0,001)

4.7.4 Zusammensetzung der Galle

Die gesammelte Galle und das Plasma wurden mittels UPLC-MS/MS auf ihre Zusammensetzung untersucht. Hierbei wurden unkonjugierte und konjugierte, primäre und sekundäre Gallensäuren und zusätzlich der Cholesterol- und Phospholipidgehalt bestimmt.

Bei normalen Fütterungsbedingungen unterscheiden sich die *Slc10a5*-Knockout-Mäuse weder in der Gesamtkonzentration noch hinsichtlich Taurin- und Glycin-konjugierter Gallensäuren sowie unkonjugierter Gallensäuren von den Wildtyp-Tieren. Alle vier Kategorien an Gallensäuren stiegen durch die Fütterung mit Cholsäure statistisch signifikant an. Zusätzlich ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen. Bei beiden Genotypen stieg die Gesamtkonzentration der Gallensäuren in Galle und Plasma gleich an, jedoch grün-

dete sich dieser Anstieg bei den Wildtyp-Mäusen vor allem auf eine Zunahme von Taurin-konjugierten Gallensäuren, bei den Knockout-Mäusen jedoch auf die Zunahme von unkonjugierten Gallensäuren. Die Konzentration der Glycin-konjugierten Gallensäuren vervielfachte sich bei beiden Genotypen, stellte aber absolut gesehen immer noch nur einen untergeordneten Anteil aller Gallensäuren dar (Abb. 4.34 A).

Die Gallensäurekonzentrationen im Plasma waren generell sehr inhomogen und konnten nicht bei allen vier Gruppen aus dem vollen Stichprobenumfang bestimmt werden. So konnte nur von drei mit Cholsäure gefütterten Slc10a5-Knockout-Mäusen ausreichend Plasma gewonnen werden. Bei drei mit Cholsäure gefütterten Wildtyp-Mäusen gelang die Katheterisierung der Gallenblase nicht, und es konnte nur eine geringere Menge Galle durch Punktion der Gallenblase gewonnen werden. Aufgrund der austretenden Galle musste der Versuch früher beendet werden, und der Blutentnahmezeitpunkt wurde vorgezogen. Dadurch liegen die Plasmakonzentrationen der Gallensäuren höher als die der planmäßig entnommenen Blutwerte und sorgen für eine größere Streuung der Werte. Dennoch spiegeln die Plasmawerte das Verhalten der Konzentrationen in der Galle wider (Abb. 4.34 B).

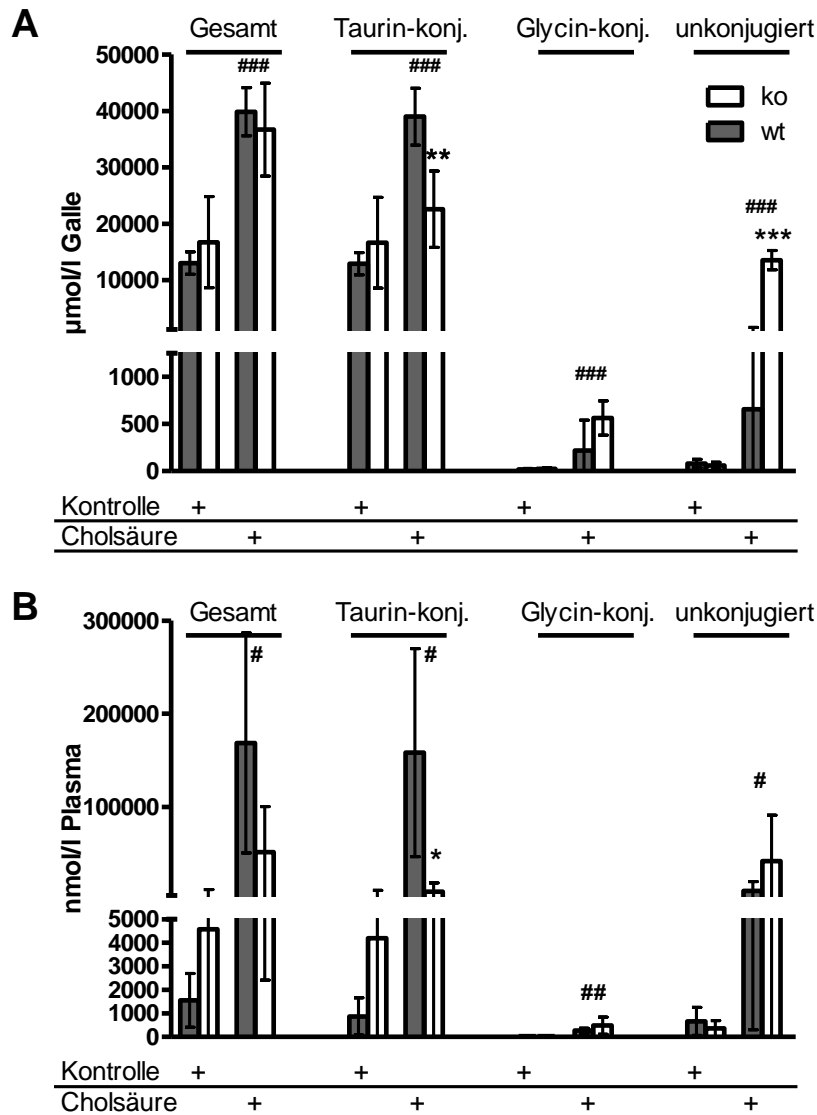


Abb. 4.34 Gallensäurekonzentrationen in der Galle und dem peripheren Plasma von *Slc10a5*-Wildtyp- und -Knockout-Mäusen unter Kontrollfutter und 0,5 % Cholsäurefutter

Die von den Mäusen nach einer Woche Fütterung mit entweder Standardhaltungsdiät (Kontrolle) oder 0,5 % Cholsäure-haltigem Futter (Cholsäure) gewonnenen Galle- und Plasmaproben wurden mittels UPLC-MS/MS auf 25 Gallensäuren untersucht (siehe Tab. 4.3 und Tab. 4.4). Für jede Maus wurden jeweils die unkonjugierten sowie die Taurin- und Glycin-konjugierten Gallensäuren addiert und die Gesamtkonzentration errechnet. Die Gallensäurekonzentrationen in der Galle (**A**) und dem Plasma (**B**) sind abgebildet. *Slc10a5*-Knockout-Mäuse sind durch weiße Balken, die Wildtypen durch graue Balken gekennzeichnet. Die Werte werden dargestellt als MW \pm SD. Die Gruppengröße war bei (**A**) $n = 4$ (ko Cholsäure, ko Kontrolle und wt Kontrolle) und $n = 5$ (wt Cholsäure) und bei (**B**) $n = 4$ (ko Kontrolle und wt Kontrolle), $n = 5$ (wt Cholsäure) und $n = 3$ (ko Cholsäure). Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller Anova mit Bonferroni-Post-Test.

signifikanter Einfluss des Faktors Fütterung (# $p < 0,05$; ### $p < 0,001$) * signifikanter Unterschied zwischen wt und ko (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Wie in Abb. 4.35 zu sehen ist, verschob sich durch die Fütterung mit Cholsäure der Gallensäurepool zugunsten von Cholat und den daraus abgeleiteten Gallensäuren, während Chenodeoxycholat und Muricholat-Verbindungen abnahmen. Die Knockout-Mäuse zeigten unter Cholsäurefütterung eine Zunahme der unkonjugierten Gallensäuren Cholat, Murocholat und 7-oxo-Deoxycholat in der Galle. Im Gegenzug schienen die Wildtyp-Mäuse die zugefütterte Cholsäure fast vollständig in Taurocholat und Taurodeoxycholat umzusetzen und so in die Galle abzugeben. Die Menge an Glycin-konjugiertem Cholat nahm bei den Knockout-Mäusen signifikant gegenüber dem Wildtyp zu, was jedoch bezogen auf die Gesamtkonzentration nur eine untergeordnete Rolle im Vergleich zum Taurokonjugat spielt. Obwohl konjugiertes Muricholat bei beiden Genotypen unter Cholsäurefütterung stark zurückging, nahm auch hier bei den Knockout-Mäusen die Konzentration von unkonjugiertem Muricholat zu. Der Anteil an den sekundären Gallensäuren, die durch bakterielle Metabolisierung aus Cholsäure im Darm entstehen, nahm durch die Zufuhr von Cholsäure mit dem Futter erwartungsgemäß zu. Jedoch wurde Deoxycholat nur bei den Wildtyp-Mäusen massiv als Taurin-konjugierte Gallensäure in die Galle abgegeben, während bei den Knockout-Mäusen die Konzentration an Taurodeoxycholat im Vergleich zur Kontrollfuttergruppe sogar sank. Stattdessen kam es zu einem massiven Anstieg von unkonjugiertem 7-oxo-Deoxycholat bei den Knockout-Mäusen nach Cholsäurefütterung, während sich bei beiden Genotypen die Konzentration von Tauro-7-oxo-Deoxycholat verdoppelte (Abb. 4.35, Tab. 4.1).

Die Plasmawerte bestätigten im Wesentlichen die in der Galle gesehenen Tendenzen. Es fielen auch hier besonders die hohen Konzentrationen an unkonjugiertem Cholat und 7-oxo-Deoxycholat und der geringe Anteil an Deoxycholat bei der mit Cholsäure gefütterten Knockout-Maus auf (Tab. 4.4).

Die mit Cholsäure gefütterten Knockout-Mäuse zeigten damit im Vergleich zu den Wildtypen vor allem eine erhöhte Ausscheidung von unkonjugierten Gallensäuren (Cholat, Murocholat und 7-oxo-Deoxycholat) in die Galle und eine Veränderung im Pool der sekundären Gallensäuren mit einer massiv geringeren Konzentration von Taurodeoxycholat.

Ergebnisse

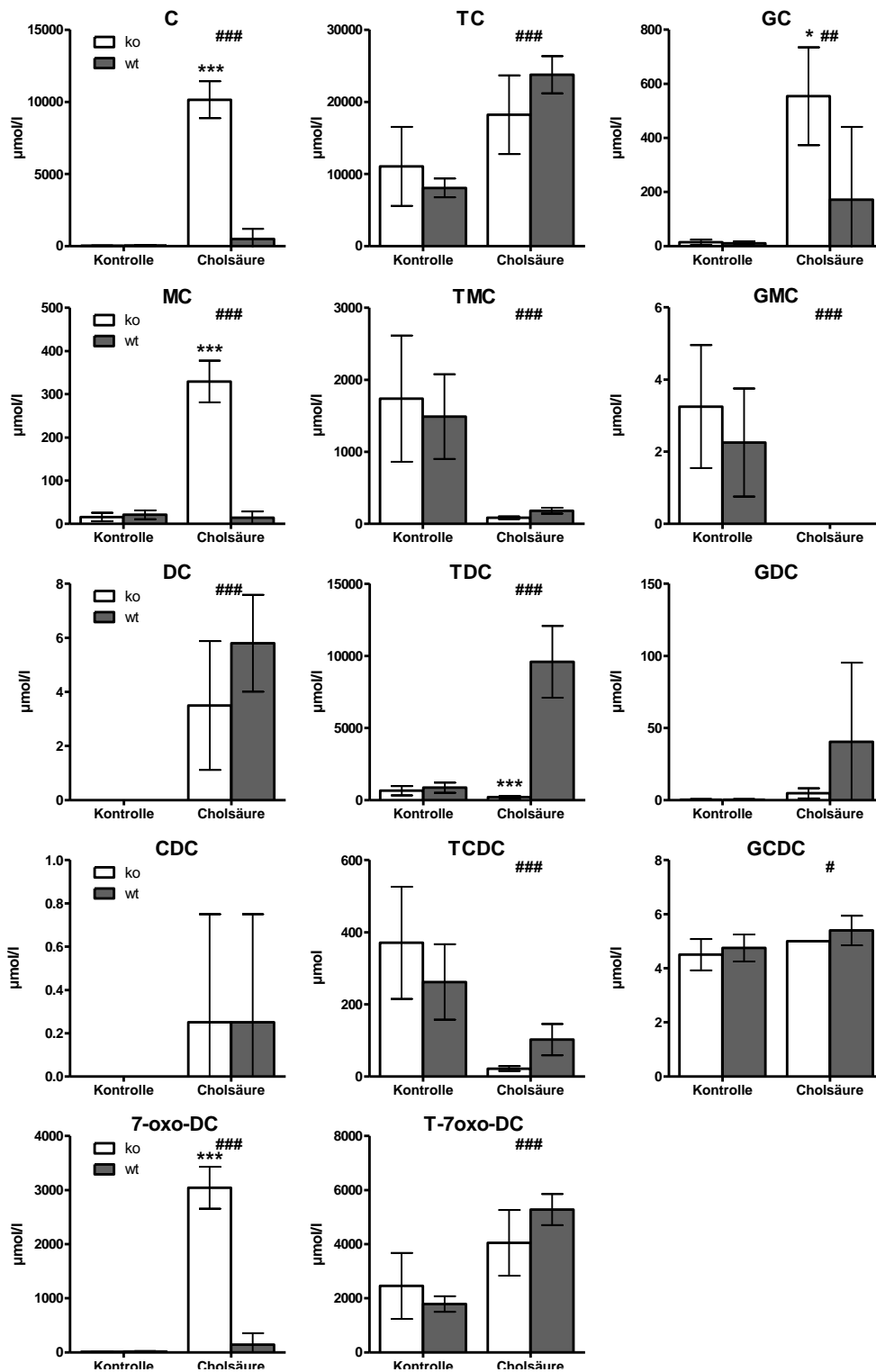


Abb. 4.35 Gallensäurekonzentrationen in der Galle von *Slc10a5*-Wildtyp- und -Knockout-Mäusen bei Kontroll- und 0,5 % Cholsäurefütterung

Die von den Mäusen nach einer Woche Fütterung mit entweder Standardhaltungsdiät (Kontrolle) oder 0,5 % Cholsäure-haltigem Futter (Cholsäure) gewonnenen Galleproben wurden mittels UHPLC-MS/MS auf die Konzentration der Gallensäuren untersucht. Die unkonjugierten (linke Spalte) sind mit den korrespondierenden Taurin- (Mitte) bzw. Glycin-konjugierten (rechts) Gallensäuren dargestellt.

Gruppengröße: n = 4 (ko Kontrolle, ko Cholsäure, wt Kontrolle), n = 5 (wt Cholsäure)

statistische Signifikanz des Faktors Fütterung bei der zweifaktoriellen Anova (# p < 0,05; ## p < 0,01; ### p < 0,001); * statistische Signifikanz zwischen Knockout und Wildtyp im Bonferroni-Post-Test (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001)

Tab. 4.3 Gallensäurekonzentrationen in der Galle von *Slc10a5*-Wildtyp- und -Knockout-Mäusen bei Kontroll- und 0,5 % Cholsäurefütterung

n. d. = nicht detektierbar; statistische Auswertung siehe Anhang Tab. 9.1

Gallensäure ($\mu\text{mol/l}$)	<u>Kontrollfutter</u>		<u>0,5 % Cholsäurefutter</u>	
	Knockout	Wildtyp	Knockout	Wildtyp
C	31,2 \pm 20,3	43,9 \pm 26,3	10149,6 \pm 1286,2	488,7 \pm 700,9
α/ω-MC	0,1 \pm 0,1	1,2 \pm 1,5	261,2 \pm 59,5	3,7 \pm 4,2
β-MC	15,7 \pm 10,1	20,3 \pm 11,1	68,6 \pm 21,6	10,5 \pm 10,5
CDC	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,3 \pm 0,2	0,2 \pm 0,2
DC	n. d.	n. d.	3,3 \pm 2,5	6,0 \pm 1,9
UDC	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
HDC	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
LC	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
LCS	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
7-oxo-DC	10,6 \pm 6,9	14,9 \pm 8,9	3044,9 \pm 385,9	146,6 \pm 210,3
TC	11053,8 \pm 5470,7	8064,1 \pm 1305,1	18224,4 \pm 5458,3	23769,4 \pm 2587,8
TMC	1737,4 \pm 875,6	1488,6 \pm 588,1	84,7 \pm 18,7	181,1 \pm 40,0
TCDC	370,8 \pm 155,4	261,8 \pm 104,6	21,9 \pm 6,7	102,2 \pm 43,8
TDC	651,3 \pm 316,0	862,8 \pm 351,6	202,7 \pm 102,4	9587,2 \pm 2490,3
TUDC	147,9 \pm 8n. d.	109,5 \pm 18,1	4,9 \pm 2,7	12,7 \pm 5,8
THDC	213,7 \pm 145,1	342,2 \pm 130,9	1,4 \pm 0,9	37,3 \pm 34,1
TLC	5,3 \pm 4,1	4,6 \pm 1,5	n. d. \pm n. d.	2,4 \pm 1,1
T-7oxo-DC	2456,4 \pm 1215,7	1792,0 \pm 290,0	4049,9 \pm 1213,0	5282,1 \pm 575,1
GC	14,5 \pm 10,2	10,2 \pm 7,1	553,9 \pm 180,6	172,2 \pm 268,4
GMC	3,3 \pm 1,7	2,3 \pm 1,5	n. d.	n. d.
GCDC	4,7 \pm 0,4	4,8 \pm 0,4	5,1 \pm 0,2	5,4 \pm 0,7
GDC	0,5 \pm 0,3	0,4 \pm 0,2	4,6 \pm 3,4	50,3 \pm 54,8
GUDC	0,2 \pm 0,2	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,3
GHDC	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
GLC	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

Tab. 4.4 Gallensäurekonzentrationen im peripheren Plasma von *Slc10a5*-Wildtyp- und -Knockout-Mäusen bei Kontroll- und 0,5 % Cholsäurefütterung

Kontrollfutter wt ko n = 4, Cholatfutter ko n = 3, wt = 5; n. d. = nicht detektierbar
statistische Auswertung siehe Anhang Tab. 9.2

Gallensäure (nmol/l)	<u>Kontrollfutter</u>		<u>0,5 % Cholsäurefutter</u>	
	Knockout	Wildtyp	Knockout	Wildtyp
C	112,5 ± 104,9	324,5 ± 446,1	23912,7 ± 24273,1	3326,9 ± 3910,6
α/ω-MC	31,6 ± 39,2	61,3 ± 62,6	1209,2 ± 1904,2	148,0 ± 177,0
β-MC	115,9 ± 139,5	63,5 ± 74,8	1155,6 ± 1380,7	108,5 ± 107,3
CDC	11,2 ± 8,2	19,9 ± 11,7	54,1 ± 62,3	20,8 ± 25,6
DC	51,5 ± 30,9	103,6 ± 98,5	895,2 ± 792,4	6280,8 ± 5454,5
UDC	6,9 ± 10,1	9,9 ± 9,8	22,8 ± 23,9	10,8 ± 16,6
HDC	7,7 ± 9,9	31,6 ± 35,9	151,0 ± 239,6	50,2 ± 62,6
LC	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
LCS	2,6 ± 1,2	n. d.	n. d.	n. d.
7-oxo-DC	11,3 ± 10,6	41,3 ± 62,9	14408,3 ± 20862,4	14n. d. ± 169,5
TC	2382,1 ± 3566,8	297,9 ± 203,0	7559,4 ± 8147,8	72808,7 ± 69464,0
TMC	634,6 ± 969,1	94,6 ± 63,1	134,1 ± 87,9	1553,2 ± 1607,4
TCDC	84,6 ± 108,3	7,0 ± 5,1	15,2 ± 9,6	450,2 ± 504,3
TDC	507,4 ± 832,8	350,9 ± 455,6	735,9 ± 801,4	78413,6 ± 44005,2
TUDC	42,3 ± 62,6	17,8 ± 22,9	5,6 ± 5,3	86,1 ± 88,7
THDC	69,1 ± 97,4	25,3 ± 26,5	1,1 ± 1,9	226,5 ± 345,0
TLC	2,5 ± 2,2	2,3 ± 2,4	2,5 ± 0,8	29,2 ± 33,9
T-7oxo-DC	477,5 ± 774,2	69,3 ± 57,3	622,0 ± 451,8	473n. d. ± 4737,4
GC	6,7 ± 6,1	7,5 ± 8,8	439,6 ± 354,9	179,0 ± 98,5
GMC	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
GCDC	21,4 ± 1,9	22,9 ± 1,1	26,1 ± 4,4	22,0 ± 1,0
GDC	1,1 ± 0,9	1,1 ± 0,4	8,3 ± 6,3	58,7 ± 22,5
GUDC	0,4 ± 0,5	0,7 ± 0,4	0,6 ± 0,5	0,6 ± 0,5
GHDC	0,2 ± 0,4	n. d.	n. d.	0,4 ± 0,5
GLC	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,6 ± 0,5

Cholesterin- und Phospholipidkonzentrationen

Erst nach der Ermittlung der Gallensäurekonzentrationen wurden auch die Konzentrationen von Cholesterin und Phospholipiden in der Galle und dem Plasma mittels UHPLC-MS/MS bestimmt. Deswegen stand von einigen Proben zu diesem Zeitpunkt nicht mehr genügend Material zur Verfügung, sodass der Stichprobenumfang je Gruppe zwischen 2 und 4 variiert (siehe Legende Abb. 4.36), was die Aussagekraft der statistischen Auswertung schmälert.

Die ermittelten Galle und Plasmakonzentrationen für Cholesterin und Phospholipide unterschieden sich bei Standardfütterung nicht zwischen den *Slc10a5*-Knockout- und Wildtyp-Mäusen, jedoch beeinflusste die Cholsäurefütterung die gemessenen Konzentrationen. In der Galle kam es für beide Parameter zu einem signifikanten Anstieg auf etwa das dreifache Ni-

veau. Dabei zeigten jedoch die Knockout-Mäuse einen signifikant geringeren Anstieg des Cholesterols im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen, während sich für die Phospholipide keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen ergaben. Die Plasmawerte des Cholesterols blieben relativ konstant, während die Phospholipidspiegel nach Cholsäurefütterung um ein Drittel sanken. Der Genotyp beeinflusste die Konzentrationen nicht (Abb. 4.36).

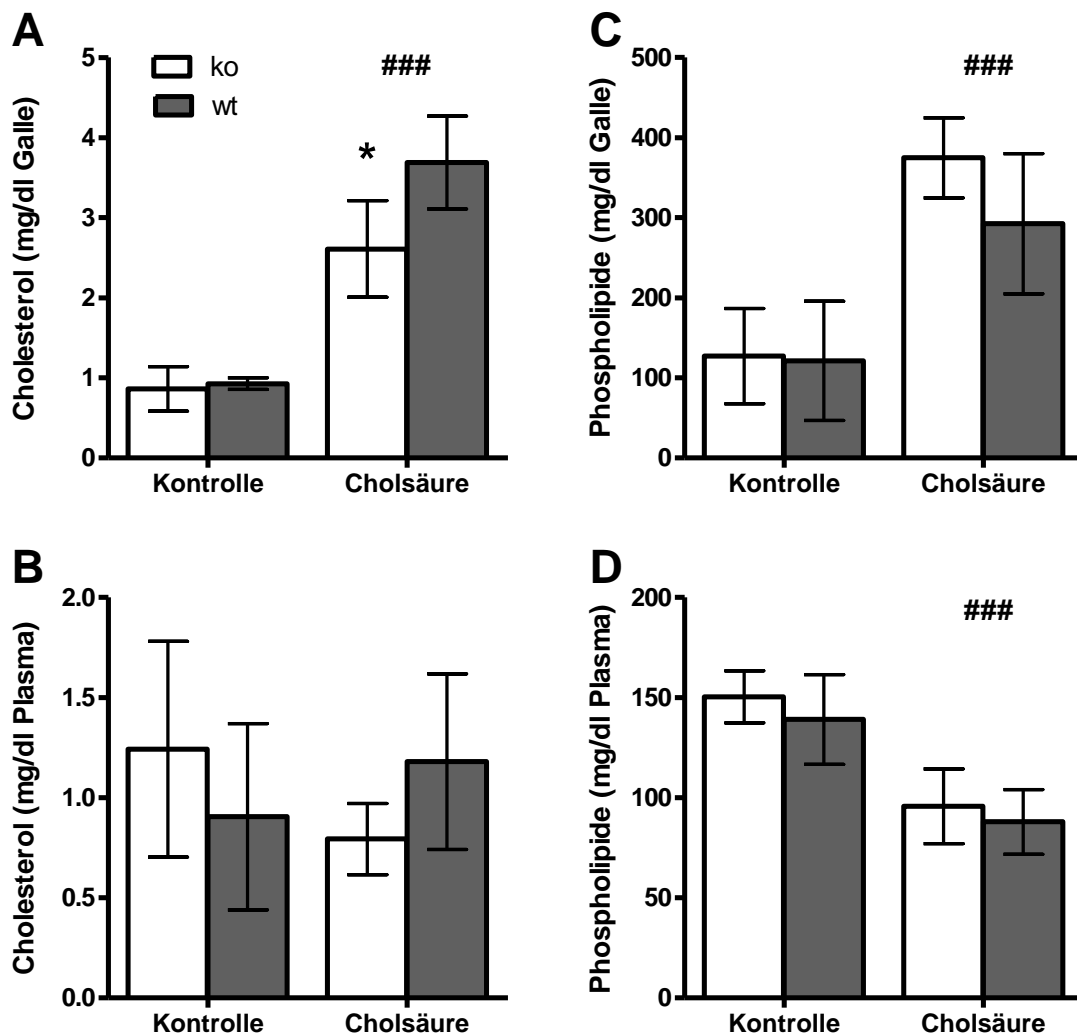


Abb. 4.36 Cholesterol- und Phospholipidgehalte in Galle und Plasma

Die von den Mäusen nach einer Woche Fütterung mit entweder Standardhaltungsdiät (Kontrolle) oder 0,5 % Cholsäure-haltigem Futter (Cholsäure) gewonnenen Galle- und Plasmaproben wurden mittels UPLC-MS/MS auf ihre Konzentration an Cholesterol und Phospholipiden untersucht.

(A) Cholesterolkonzentration Galle

(B) Cholesterolkonzentration Plasma

(C) Phospholipide Galle (n = 4, wt Cholsäure n = 3)

(D) Phospholipide Plasma (Kontrollfutter n = 4, Cholsäure ko n = 3, wt n = 2)

Gruppengrößen: (A) n = 4 (wt Kontrolle, ko Kontrolle, ko Cholsäure); n = 2 (wt Cholsäure);

(B, D) n = 4 (wt Kontrolle, ko Kontrolle); n = 3 (ko Cholsäure); n = 2 (wt Cholsäure); (C) n = 4 (wt Kontrolle, ko Kontrolle, ko Cholsäure); n = 3 (wt Cholsäure)

statistische Signifikanz des Faktors Fütterung bei der zweifaktoriellen Anova (### p < 0,001)

* statistische Signifikanz zwischen Knockout und Wildtyp durch Bonferroni-Post-Test (* p < 0,05)

4.7.5 Unterschiede der Genexpression der *Slc10a5*-Knockout- und Wildtyp-Maus

Die Expressionsstärke aller Gene im Lebergewebe wurde durch eine genomweite Array-Analyse aller vier im Versuch eingesetzten Gruppen bestimmt. Hierdurch sollte gezeigt werden, ob die Knockout-Mäuse unter Standardhaltungsbedingungen bestimmte Gene kompensatorisch regulieren und dadurch einen normalen Phänotyp aufweisen und welchen Einfluss die Cholsäurefütterung auf die genomweite Genexpression beider Genotypen hatte.

Mit Hilfe eines auf Excelmakros basierenden Filtertools wurden die Expressionslevel der vier Knockout-Mäuse einer Fütterungsgruppe mit allen möglichen Kombinationen der entsprechenden vier Wildtyp-Mäuse verglichen. Es wurden dadurch die Gene ausgewählt, die bei allen möglichen Quotienten von Knockout/Wildtyp gleichmäßig hoch- oder herunterreguliert waren und mindestens einmal einen zweifachen Genexpressionsunterschied zeigten, was als biologisch relevant erachtet wurde. Die verschiedenen starken Expressionsunterschiede werden in der folgenden Darstellung farblich unterschieden (Tab. 4.5 und Tab. 4.6).

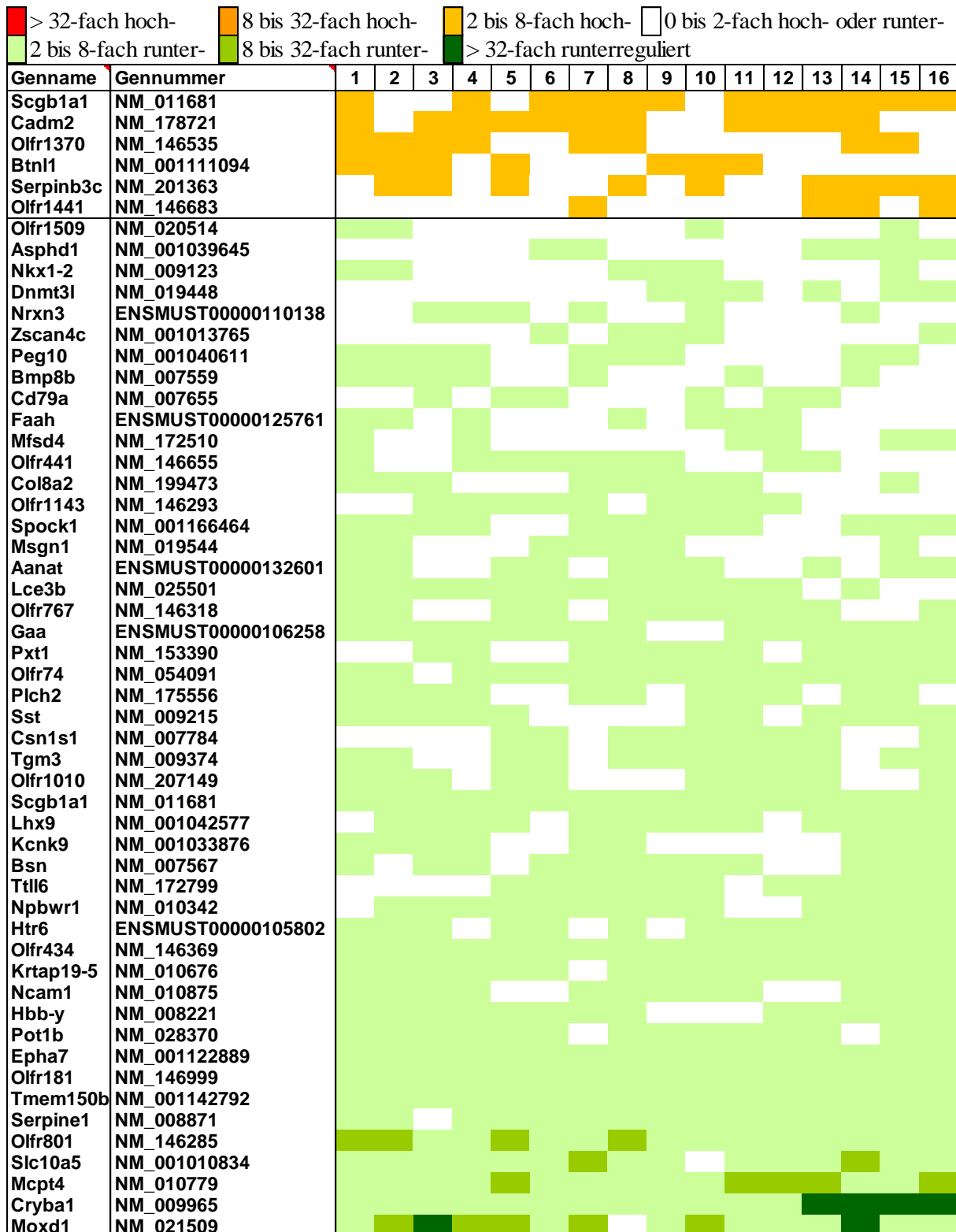
Bei Kontrollfütterung waren nur wenige Gene zwischen den Knockout- und Wildtyp-Mäusen diesen Kriterien entsprechend reguliert (Tab. 4.5). Keinem dieser Gene wurde bislang eine Rolle im Gallensäure- oder Energiestoffwechsel zugeordnet. Gene, welche für Gallensäuretransporter oder in die Synthese involvierte Enzyme codieren, wurden bei dieser Filtermethode nicht detektiert. Es konnte somit kein Hinweis auf eine durch das Fehlen des *Slc10a5* ausgelöste kompensatorische Genregulation gefunden werden, wie vorher vermutet.

Durch die Cholsäurefütterung änderte sich die Liste der regulierten Gene zwischen den Knockout- und den Wildtyp-Mäusen (Tab. 4.6). Wiederum zeigte das Filtertool aber keine Gene an, die an der Aufrechterhaltung der Gallensäurehomöostase beteiligt sind. Einzig die in den Knockout-Mäusen massiv stärkere Expression von *Acot3*, codierend für die Acyl-CoenzymA-Thioesterase, fiel auf. Dieses Enzym ist in den Fettsäuremetabolismus involviert und spaltet CoenzymA von aktivierten Fettsäuren ab.

Tab. 4.5 Heat Map: Genexpression bei Kontrollfütterung *Slc10a5*-Knockout-/Wildtyp

Zum Vergleich der Genexpression der *Slc10a5*-Knockout-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen wurde aus den normalisierten Arraydaten mittels eines Excelmakros auf die Gene gefiltert, die eine konsistente Regulierung von mindestens einmal größer Faktor 2 aufweisen. Als Schwellenwert der Intensität wurde 50 und als Surrogatwert 15 definiert. Kaum charakterisierte Gene wurden ausgeschlossen.

Alle möglichen Quotienten aus den Expressionsdaten der mit Kontrollfutter gefütterten Knockout- (n = 4)/Wildtyp-Mäuse (n = 4) wurden gebildet und dargestellt. Es ergaben sich 16 mögliche Quotienten (Spalten 1 bis 16).



Tab. 4.6 Heat Map: Genexpression bei Cholsäurefütterung *Slc10a5*-Knockout-/Wildtyp

Die Auswertung erfolgte wie in Tab. 4.5. Alle möglichen Quotienten aus den Expressionsdaten der mit 0,5 % Cholsäurefutter gefütterten Knockout- (n = 4)/Wildtyp-Mäuse (n = 4) wurden gebildet und dargestellt (Spalten 1 bis 16)

Genname	Gennummer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Cux2	NM_007804																
Acot3	NM_134246																
Unc79	NM_001081017																
Maff	NM_010755																
Pogk	NM_175170																
Pot1b	NM_028370																
Olfr1370	NM_146535																
Herpud1	NM_022331																
Olfr1441	NM_146683																
Lpin2	NM_001164885																
Vpreb3	NM_009514																
Serpinb3c	NM_201363																
Cyp2a4	NM_009997																
Ascl1	NM_008553																
Scgb1a1	NM_011681																
Celsr2	NM_001004177																
Prrg4	NM_178695																
Tmem116	NM_001161627																
Fam5b	NM_207583																
Trim7	NM_053166																
Olfr1316	NM_146742																
Fam92a	ENSMUST00000152219																
Olfr74	NM_054091																
Serpinb3c	NM_201363																
Zc3h12d	NM_172785																
Stk11ip	NM_027886																
Scgb1a1	NM_011681																
Dpp10	NM_199021																
Olfr139	NM_147003																
Pkd1l2	NM_029686																
Dbn2d2	NM_026797																
Nipa1	NM_153578																
Hbb-bh1	NM_008219																
Nkx1-2	NM_009123																
Jakmip1	ENSMUST00000121010																
Kcnk9	NM_001033876																
Cdkn1a	NM_007669																
Olfr441	NM_146655																
Ttbk1	NM_001162864																
Tgm3	NM_009374																
Dfna5	NM_018769																
Fst	NM_008046																
Lce3b	NM_025501																
S100a10	NM_009112																
Slc10a5	NM_001010834																
G6pdx	NM_008062																
Olfr181	NM_146999																
Tmem139	NM_175408																
Elf3	NM_007921																
Pot1b	NM_028370																
Hist3h2ba	NM_030082																
Fbxw15	NM_199036																
Olfr801	NM_146285																
Lcn2	NM_008491																
Chrm3	NM_033269																
Fam198a	NM_177743																
Elovl3	NM_007703																
Cyp21a1	NM_009995																
Sprr1a	NM_009264																
Ly6d	NM_010742																

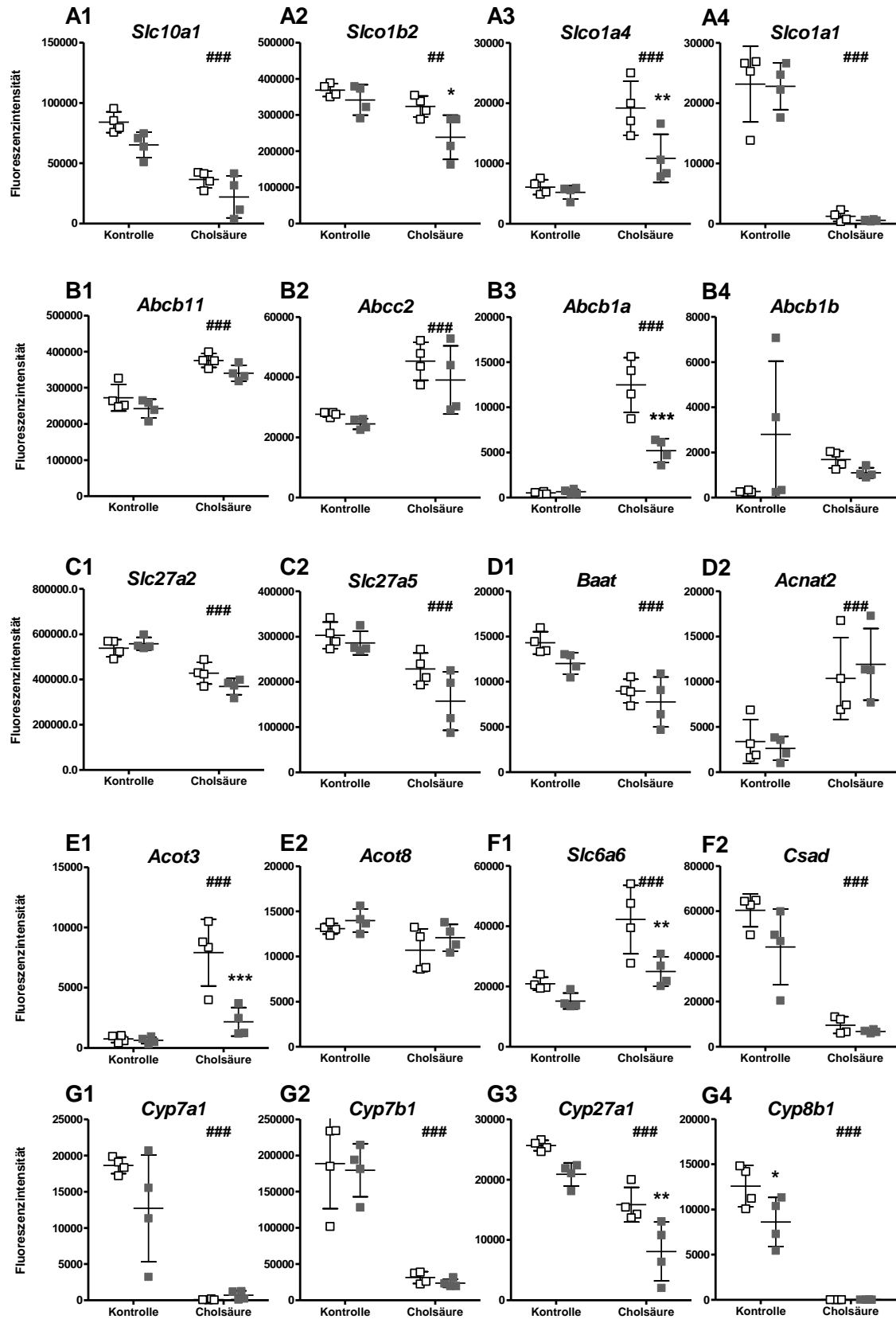
4.7.6 Genexpressionsunterschiede zwischen *Slc10a5*-Knockout- und Wildtyp-Maus mit Bezug zur Gallensäurehomöostase

Das automatische Filtern nach mindestens zweifach zwischen den *Slc10a5*-Knockout- und Wildtyp-Mäusen regulierten Genen zeigte keine Ergebnisse für die in die Gallensäurehomöostase involvierten Gene an. Betrachtet man jedoch den Effekt durch die Cholsäurefütterung, so zeigten sich die Gene beeinflusst, die für Gallensäuretransporter, Gallensäure synthetisierende oder metabolisierende Enzyme codieren (siehe Anhang Tab. 9.4 bis 9.7). Die durch das Filtertool generierten Listen der durch die Cholsäurefütterung regulierten Gene offenbarten, dass anscheinend in den Knockout-Mäusen Gene anders reguliert wurden als in den Wildtyp-Mäusen. Deswegen sollten diese Gene sowie andere potenziell für die Gallensäurehomöostase wichtige Gene im Detail betrachtet und ihre Expressionen verglichen werden (Abb. 4.37).

Im Folgenden sind die Veränderungen dieser Genexpressionen beschrieben. Dabei werden zusätzlich zu den kursiv geschriebenen Gennamen geläufige Proteinamen in Klammern angegeben, wenn diese von der Genbezeichnung abweichen. Auch wenn beispielsweise von Transporterexpression die Rede ist, ist immer die Expression des Gens gemeint.

Es zeigte sich, dass die 0,5 % Cholsäurefütterung die Expression fast aller betrachteten Gene beeinflusste. Die Gallensäureaufnahmetransporter *Slc10a1* (NTCP), *Slc10b2* (OATP1B2) und *Slc10a1* (OATP1A1) wurden durch die Gallensäurefütterung herabreguliert, während die Expression von *Slc10a4* (OATP1A4) vor allem in den Knockout-Mäusen anstieg (Abb. 4.37 A). Für die kanalikulären Effluxtransporter zeigte sich eine Erhöhung der Genexpression (Abb. 4.37 B). Die Genexpression der an der Gallensäurebiosynthese beteiligten Cytochrom-P450-Enzyme *Cyp7a1*, *Cyp7b1*, *Cyp27a1* und *Cyp8b1* wurde sehr stark vermindert (Abb. 4.37 G). *Slc27a2* und *Slc27a5*, die für Gallensäure-CoenzymA-Synthetasen codieren, sowie *Baat*, das Gen für die Gallensäureaminotransferase, wurden durch die Cholsäurefütterung ebenfalls vermindert (Abb. 4.37 (C, D1)). Die Expression von *Acnat2*, der Acyl-N-Aminotransferase 2, stieg hingegen (Abb. 4.37 D2). Die Genexpression der Acyl-CoenzymA-Thioesterase *Acot3* nahm zu, insbesondere in der Knockout-Maus, wogegen die von *Acot8* unverändert blieb (Abb. 4.37 E). Das Taurintransportergen *Slc6a6* (TAUT) wurde vermehrt transkribiert nach Cholsäurefütterung, vor allem in den Knockout-Mäusen. Die Expression von *Csad*, der Cystein-Sulfinat-Decarboxylase, welche in Leberzellen Taurin aus Cystein synthetisiert, sank hingegen (Abb. 4.37 F). Durch die Cholsäurefütterung stieg die Transkription der für das Cholesterin-Transporterdimer ABCG5/8 codierenden Gene *Abcg5* und *Abcg8* ebenso wie von *Abcb4*, das für den Phospholipidtransporter MDR3 codiert, wobei der Zuwachs bei den Knockout-Mäusen stärker ausfiel (Abb. 4.37 H).

Ergebnisse



Ergebnisse

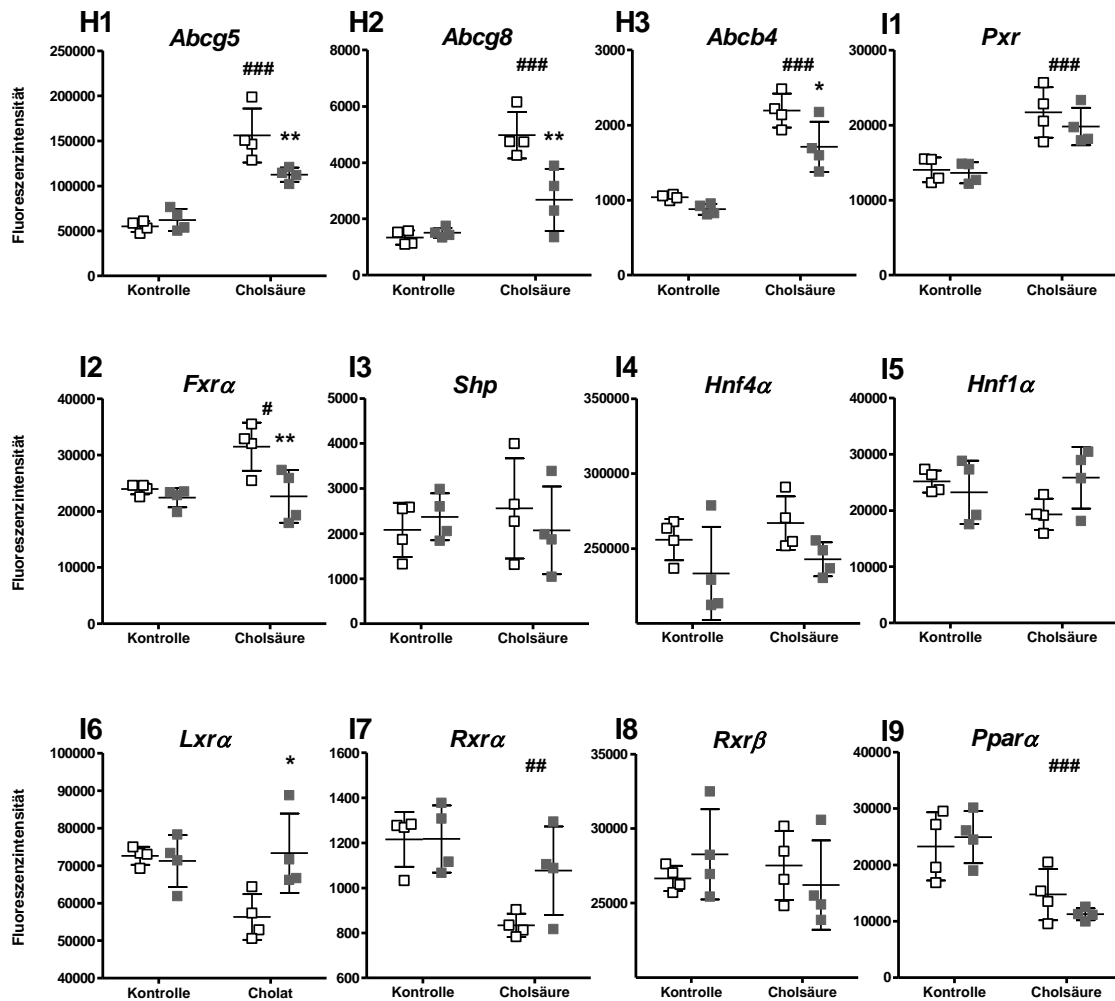


Abb. 4.37 Vergleich der Genexpression im Lebergewebe

Von den *Slc10a5*-Knockout- und Wildtyp-Mäusen wurde nach einer Woche Fütterung mit entweder Standardhaltungsdiät (Kontrolle) oder 0,5 % Cholsäure-haltigem Futter (Cholsäure) Lebergewebe gewonnen. Aus diesem wurde RNA isoliert und die Genexpressionen mittels genomweiter Array-Analyse bestimmt. Es werden potenziell die Gallensäurehomöostase beeinflussende Gene abgebildet:

(A) sinusoidale Aufnahmetransporter, (B) kanalikuläre Effluxtransporter, (C) Gallensäure-CoenzymA-Ligasen, (D) Gallensäureaminotransferasen, (E) Thioesterasen, (F) Taurintransporter, (G) Effluxtransporter für Cholesterin (1, 2), Phospholipide (3) und (H) Kernrezeptoren

Dargestellt sind sowohl MW \pm SD als auch die Einzelwerte der Knockout- (weiße Quadrate) und Wildtyp-Mäuse (graue Quadrate) von jeweils n = 4 Tieren pro Gruppe.

Statistische Signifikanz des Faktors Fütterung bei der zweifaktoriellen Anova (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$); * Statistische Signifikanz zwischen Knockout und Wildtyp durch Bonferroni-Post-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Auch die Expression der Kernrezeptoren wurde bestimmt. Sie zeigte sich konstant bei *Hnf1α*, *Hnf4α*, *Shp* und *Rxrβ*, während die von *Pxr* bei beiden Genotypen stieg und die von *Fxr* leicht durch die Cholsäuresäurefütterung zunahm, vor allem bei den Knockout-Mäusen. *Ppara* wurde bei beiden Genotypen vermindert, und *Lxrα*- und *Rxrα*-Expression sanken im Knockout-Lebergewebe, aber nicht dem Wildtyp-, durch die Cholsäurefütterung. (Abb. 4.37 I).

4.7.7 Genexpression von Gallensäuretransportern in Dünndarm und Niere

Da für die Unterschiede im Gallensäurepool der mit Cholsäure gefütterten Knockout- und Wildtyp-Mäuse nicht nur die Leber, sondern auch die enterohepatische Zirkulation und die Reabsorption in der Niere eine Rolle spielen, sollte auch die Expression von Transportern untersucht werden, die im Darm und der Niere Gallensäuren transportieren. Die mRNA-Expression wurde mittels relativer Quantifizierung in der Real-Time-PCR bestimmt. Die Genexpression wurde dabei mit dem endogenen Kontrollgen *Hprt* normalisiert, da dieses als stabil exprimiert in den verwendeten Organen galt (Wang et al. 2010; Shi et al. 2010), was sich in dieser Untersuchung bestätigte. Großes Augenmerk wurde dabei vor allem auf die Transportergene *Slc10a2* (*Asbt*), *Osta* und *Ostβ* gelegt, welche die Aufnahme von konjugierten Gallensäuren im Ileum ermöglichen.

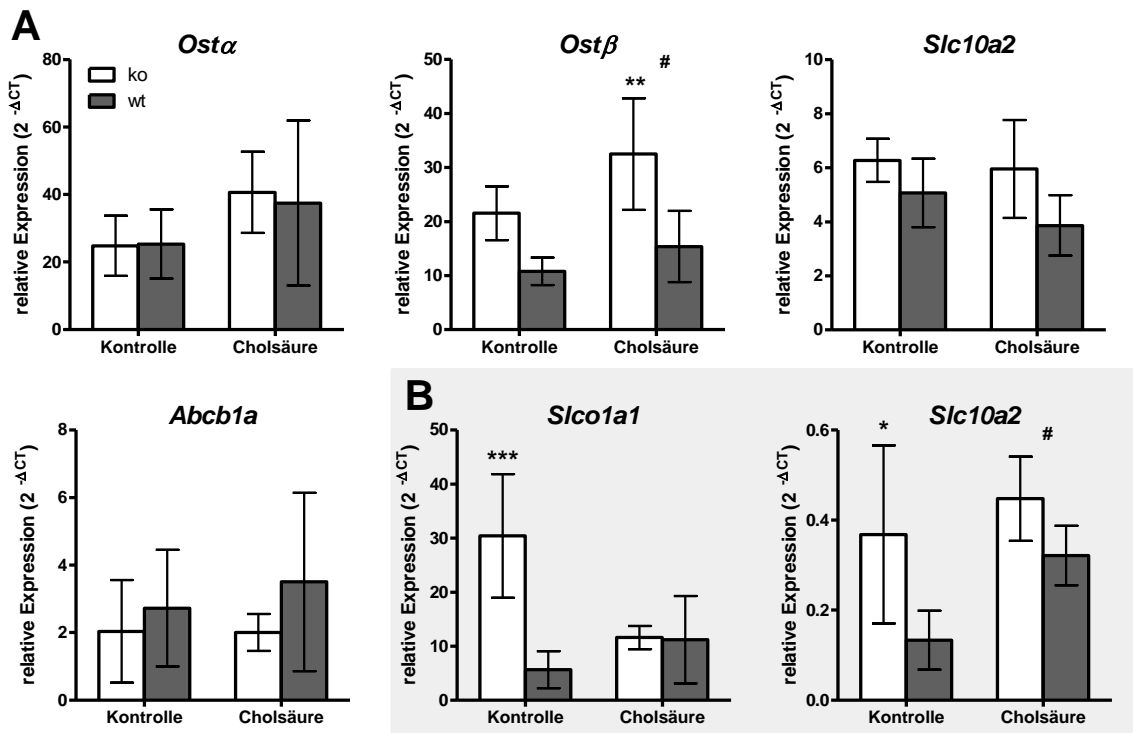


Abb. 4.38 Transportergenexpression in Dünndarm (A) und Niere (B)

Aus von den *Slc10a5*-Knockout- und Wildtyp-Mäusen nach einer Woche Fütterung mit entweder Standardhaltungsdiät (Kontrolle) oder 0,5 % Cholsäure-haltigem Futter (Cholsäure) entnommenen Gewebeproben des terminalen Ileums und der Niere wurde RNA isoliert, in c-DNA umgeschrieben und 50 µg pro Ansatz in die quantitative Real-Time-PCR eingesetzt. Die Normalisierung erfolgte mittels Δ -Ct-Methode auf den Housekeeper *Hprt* und die Expression wurde mit 2^{-ΔCt} transformiert. Die Genexpression der Transporter *Osta*, *Ostβ*, *Slc10a2* (*Asbt*) und *Abcb1a* (*Mdr1*) im terminalen Ileum (A) und von *Slco1a1* (*Oatp1a1*) und *Slc10a2* in der Niere (B) wurde bestimmt.

Angegeben sind MW ± SD von n = 4 Tieren pro Gruppe.

statistische Signifikanz des Faktors Fütterung bei der zweifaktoriellen Anova (# p < 0,05; ## p < 0,01); * statistische Signifikanz zwischen Knockout und Wildtyp durch Bonferroni-Post-Test (* p < 0,05; ** p < 0,01)

Die Expression von *Osta* und *Slc10a2* war bei allen vier Mäusegruppen konstant. Hingegen stieg die Expression von *Ost β* durch die Cholsäurefütterung an, und die bei Kontrollfütterung bereits sichtbar höhere Expression bei den Knockout-Mäusen erreichte das Signifikanzniveau. Im Gegensatz zur Leber, wo durch die Cholsäurefütterung *Abcb1a* massiv hochreguliert wurde, blieb die Expression im Darm konstant (Abb. 4.38 A). In der Niere wurde die Expression von *Slco1a1* und *Slc10a2* bestimmt (Abb. 4.38 B). Unter normaler Fütterung wiesen die Knockout-Mäuse eine wesentlich höhere Expression von *Slco1a1* auf als die Wildtypiere. Durch die Cholsäurefütterung sank die Expression bei den Knockout-Mäusen wieder auf das Niveau der Wildtypen ab. Auch *Slc10a2* wies unter Kontrollfütterung bei den Knockout-Mäusen eine höhere Expression auf, die sich durch Erhöhung bei den Wildtypen bei der Cholsäurefütterung wieder anglich. Die Expression von *Slc10a2* in der Niere war jedoch wesentlich geringer als im Dünndarm.

4.7.8 Expression von *Slc10a5* in Leber und Niere

Auch die Expression von *Slc10a5* in Leber und Niere wurde mithilfe der Real-Time-PCR bestimmt. Für die Proben der Knockout-Mäuse bestätigte sich das vollständige Fehlen eines *Slc10a5*-Transkripts (Daten nicht gezeigt). Die Expression von *Slc10a5* lag bei Kontrollfütterung etwa auf Höhe des endogenen Kontrollgens *Hprt*. Durch die Cholsäurefütterung wurde in der Leber eine stärkere Streuung der mRNA-Menge verursacht (Abb. 4.39 A), während sie sich in der Niere signifikant verminderte (Abb. 4.39 B).

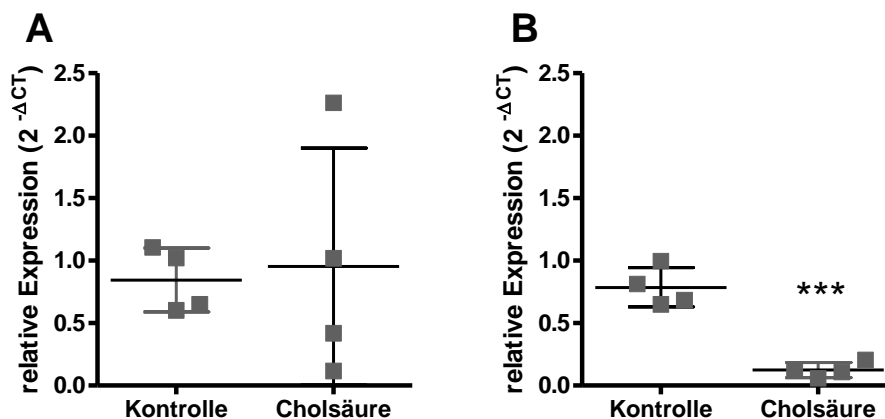


Abb. 4.39 Expression der *Slc10a5*-mRNA in Leber (A) und Niere (B)

Aus von den Wildtyp-Mäusen nach einer Woche Fütterung mit entweder Standardhaltungsdiät (Kontrolle) oder 0,5 % Cholsäure-haltigem Futter (Cholsäure) entnommenen Gewebeproben der Leber (A) und der Niere (B) wurde RNA isoliert, in c-DNA umgeschrieben und 50 μ g pro Ansatz in die quantitative Real-Time-PCR eingesetzt. Die Normalisierung erfolgte mittels Δ Ct-Methode auf den Housekeeper *Hprt*, und die Expression wurde mit $2^{-\Delta Ct}$ transformiert.

Die statistische Auswertung erfolgte aus n = 4 Proben je Gruppe mittels zweiseitigem t-Test. (***) $p < 0,001$.

5 Diskussion

5.1 Lokalisation von SLC10A5

Die Lokalisation des im Gewebe natürlich exprimierten SLC10A5-Proteins konnte auf subzellulärer Ebene nicht abschließend geklärt werden. Obwohl sowohl der spezifisch gegen den C-Terminus des SLC10A5-Proteins der Ratte generierte rSLC10A5-Antikörper (Eurogentec) als auch der kommerziell erhältliche hSLC10A5-Antikörper (Sigma) an transfizierten Zellen ihre spezifische Bindung an das SLC10A5-Protein beweisen konnten, wurde für beide kein belastbares Ergebnis in Gewebeschnitten erzielt (siehe 4.2.1, 4.2.3 und 4.3). Die für Rattengewebe mit dem rSLC10A5-Antikörper gezeigte mitochondriale Lokalisation muss angezweifelt werden, da eine vergleichbare Anfärbung auch in Leber-, Nieren-, Ileum- und Magenparaffinschnitten der Maus auftrat und bei den Geweben der *Slc10a5*-Knockout-Maus keine Reduktion der Antikörperbindung stattfand (siehe Abb. 4.18 und 4.21). Auffällig war hierbei, dass im Zellkulturmodell gar keine Reaktion des rSLC10A5-Antikörpers mit dem Mausprotein gezeigt werden konnte. Eine Begründung könnte sein, dass der Antikörper spezifisch mit einem hochkonservierten mitochondrialen Protein in beiden Spezies kreuzreagiert. Denn die erfolgreiche Peptidblockierung der rSLC10A5-Antikörperbindung mit dem Immunisierungspeptid zeigt, dass der Antikörper nicht unspezifisch, sondern gezielt an sein Epitop bindet. Allerdings wurden bei einer Datenbankrecherche mit dem BLAST-Algorithmus „Blastp“ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) nach Proteinen, die eine ähnliche Peptidsequenz wie das Immunisierungspeptid (CKRPLLSTENEKAPLV) aufweisen, keine Mitochondrienproteine mit übereinstimmender Peptidsequenz gefunden.

Pellicoro (Diss. 2008) konnte in ihren Untersuchungen mit zwei gegen N-terminale Sequenzen des humanen SLC10A5 gerichteten Antikörpern auch an transfizierten HepG2-Zellen keine spezifische Bindung nachweisen. Sie verwendete weiterhin ein SLC10A5-GFP Konstrukt, das translatiert aber in keinem spezifischen Zellorganell lokalisiert werden konnte, sodass sie eine Störung der Sortierung durch den GFP-Tag postulierte (Diss. Pellicoro 2008). In den eigenen Untersuchungen wurde die Lokalisation des V5-getaggten SLC10A5-Proteins untersucht (siehe Abb. 4.7 und Abb. 4.8). Der angestellte Vergleich der intrazellulären Sortierung von GFP-, V5- und Flag-getaggten humanem SLC10A5-Proteinen mit dem ungetaggtten Ratten-SLC10A5-Protein, bei dem alle Proteine ein vergleichbares Verteilungsmuster in HepG2-Zellen aufwiesen, spricht gegen eine Störung der Sortierung durch den Tag (siehe Abb. 4.5). In keiner dieser Untersuchungen an transfizierten Zellen wurde eine Lokalisation in Mitochondrien festgestellt, hingegen wurde das SLC10A5-Protein im Golgi-Apparat und in kleineren vesikulären Strukturen detektiert. Auch in SLC10A5-transfizierten U2OS-Zellen

wurde ein Golgi-artiges Verteilungsmuster gefunden (Bijsmans et al. 2012). Anhand von Computeralgorithmen gemachte Vorhersagen schlagen für SLC10A5 mehrheitlich einen Sortierungsweg über das Endomembransystem und nicht die Mitochondrien vor. Über das genaue Zielorganell gehen die Vorhersagen jedoch auseinander. Die wahrscheinlichste Lokalisation divergierte sogar im Vergleich zwischen dem SLC10A5-Protein von Mensch, Ratte und Maus. Es werden der sekretorische Pathway, das Endoplasmatische Retikulum und Peroxisomen als wahrscheinlichste Möglichkeiten vorgeschlagen (siehe 4.1.4).

Anfangs wurden Peroxisomen als Lokalisation für den SLC10A5 favorisiert. Der Transport von Gallensäureverbindungen über die peroxisomale Membran wurde bisher erst lückenhaft aufgeklärt, obwohl der nicht ATP-abhängige Export von Tauro- und Glycocholat durch die peroxisomale Membran gezeigt wurde, konnte der Transporter nicht identifiziert werden (Visser et al. 2007). Somit hätte es nahegelegen, wenn sich ein intrazellulär exprimiertes Mitglied der SLC10-Familie als dieser unbekannte Transporter herausgestellt hätte. Im Zellkulturmodell konnte jedoch keine Kolo-kalisation mit dem Peroxisomenmarker Katalase nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.7). In den für die Zelltransfektionen verwendeten Plasmiden steht SLC10A5 unter der Kontrolle des starken CMV-Promotors, was zu einer starken RNA- und schließlich auch Proteinexpression führt. Es ist nicht zu sagen, ob die unnatürlich hohe Proteinmenge zu einer Fehlsortierung und einem „Hängenbleiben“ im Golgi-Apparat geführt haben könnte. Diese Frage lässt sich in Zukunft nur mit einem Antikörper klären, der zuverlässig das zelleigene SLC10A5-Protein erkennt.

Obwohl SLC10A5 bisher im Gegensatz zu NTCP, ASBT und SOAT nicht in der Zellmembran nachgewiesen wurde, kann diese Lokalisation nicht hundertprozentig ausgeschlossen werden. Denn manche Proteine werden erst durch einen Stimulus in die Membran integriert. So wird der Einbau von NTCP in die Membran cAMP-abhängig vermittelt (Mukhopadhyay et al. 1997; Dranoff et al. 1999). Der Fettsäuretransporter FATP1 im weißen Fettgewebe, der wie der Glucosetransporter GLUT4 unter nicht stimulierten Bedingungen intrazellulär in vesikulären Golgi-abgeleiteten Strukturen liegt, wird erst durch den Stimulus Insulin in die Membran eingebaut (Bryant et al. 2002; Stahl 2004). Insofern könnte es möglich sein, dass SLC10A5 unter bestimmten Bedingungen in die Plasmamembran transloziert. Jedoch ist die rein intrazelluläre Verteilung die wahrscheinlichere Alternative. Hierfür spricht auch, dass nicht alle Mitglieder der SLC10-Familie Plasmamembranproteine sind. SLC10A4 weist eine höhere Sequenzhomologie zu NTCP, ASBT und SOAT auf als SLC10A5, und auch dieser wird intrazellulär vesikulär sortiert (Geyer et al. 2006; Burger et al. 2011).

5.2 Suche nach der Funktion

Neben der Aufklärung der Gewebeverteilung und der subzellulären Lokalisation stand die funktionelle Charakterisierung des SLC10A5-Proteins im Vordergrund dieser Arbeit.

Die Zugehörigkeit zur Familie der Na⁺-abhängigen Gallensäuretransporter legte die Vermutung nahe, dass SLC10A5 in den Transport von Gallensäuren, deren Metaboliten oder Vorläufer involviert sein könnte. Die starke Überschneidung seines Expressionsprofils mit dem von NTCP und ASBT, mit den höchsten Werten in Leber, Niere und dem Darmtrakt, bestärkte diese Hypothese (Fernandes et al. 2007; Diss. Pellicoro 2008) (siehe 4.1.2).

Die Expression von *SLC10A5* überschneidet sich zudem stark mit der von FXR, einem durch Gallensäuren aktivierten Kernrezeptor, wie Pellicoro (Diss. 2008) in ihren Untersuchungen zeigte. *In vitro* konnte sie außerdem an FXR/RXR α transfizierten HepG2-Zellen bei Zugabe des FXR-Agonisten Chenodeoxycholat zeigen, dass sich bei steigender *SHP*-Expression die *SLC10A5*-mRNA-Expression genau wie die des *NTCP* verringerte. Sie schloss daraus, dass SLC10A5, ebenso wie NTCP, gallensäureabhängig über FXR reguliert wird. Auch in gallengangligierten Ratten wurde *Slc10a5* ähnlich wie *Ntcp* herunterreguliert, was die in HepG2-Zellen erhobenen Daten bekräftigte (Diss. Pellicoro 2008). Eigene Untersuchungen an Gewebe von gallengangligierten und LPS-behandelten Ratten zeigten zudem, dass sich die *Slc10a5*-Expression zusammen mit der der Gallensäuretransportergene *Slc10a1* und *Abcb11* verminderte (siehe 4.4.1).

Trotz dieser Hinweise in Richtung des Gallensäurestoffwechsels konnte *in vitro* keine Transportaktivität für Gallensäuren nachgewiesen werden. Zu den untersuchten Substraten gehörten in *Xenopus laevis*-Oozyten die Gallensäuren Cholat und Taurocholat sowie die sulfatierten Steroide Estron-3-Sulfat und DHEAS (Fernandes et al. 2007). An intakten und permeabilisierten HEK293-Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit zudem Transportstudien mit Cholat, Deoxycholat, Ursodeoxycholat, Sarcosincholat, Taurocholat, Taurodeoxycholat, Tauroursodeoxycholat, Taurochenodeoxycholat, Glycodeoxycholat, Glycoursodeoxycholat und Glycochenodeoxycholat durchgeführt (siehe 4.5.1 und 4.5.2).

Es ist natürlich fraglich, ob mit den verwendeten Methoden eine Transportaktivität von SLC10A5 überhaupt hätte aufgeklärt werden können. Dafür spricht immerhin der nachgewiesene Gallensäuretransport über NTCP an den intakten HEK293-Zellen, der die generelle Funktionalität des Transportassays bestätigte. Über die Orientierung des Transports und möglicherweise benötigte Cofaktoren kann nur aufgrund von Analogieschlüssen zu den anderen SLC10-Familienmitgliedern oder *In-silico*-Vorhersagen spekuliert werden. Zusätzlich ist es möglich, dass sich die Tertiärstruktur des im Gewebe natürlich exprimierten SLC10A5-

Proteins von der des in transfizierten Zellen translatierten SLC10A5-Proteins unterscheidet. Ein Hinweis darauf könnte sein, dass die Antikörper an das artifiziell in den Zellen gebildete SLC10A5-Protein binden konnten, jedoch das natürlicherweise gebildete Protein in Zellen und dem Gewebe nicht erkannten. Dadurch könnten die an transfizierten Zellen gewonnenen Aussagen nicht prediktiv für die Funktion *in vivo* sein. Weiterhin ist es nicht möglich alle Gallensäurevorläuferstufen, -konjugate und -metabolite *in vitro* zu testen. Zumal es sich bei SLC10A5 nicht zwingend um einen Transporter handeln muss. Seine hohe Expression in den unterschiedlichen Abschnitten des Magen-Darm-Trakts sowie der Niere, legte zudem nahe, die Funktion des SLC10A5 nicht nur isoliert in einem Zelltyp oder einem Organ, sondern im Kontext des Gesamtorganismus zu betrachten. Deswegen wurde die *Slc10a5*-Knockout-Maus als *In-vivo*-Modell gewählt, um neue Hypothesen zur SLC10A5-Funktion zu generieren, welche dann *in vitro* in Zukunft überprüft werden können.

5.3 Die *Slc10a5*-Knockout-Maus

Die *Slc10a5*-Knockout-Maus wurde als heterozygot-defekte Hybride zwischen C57BL/6N und 129SvEvBrd bezogen. Diese F1-Hybride wurden zunächst miteinander verpaart, um homozygot defekte Tiere zu erhalten, welche dann mit ihren heterozygoten und Wildtypgeschwistern verglichen werden sollten. Dabei zeigten sich die homozygot defekten Tiere nicht nur als lebensfähig, sondern es fielen bei Adspektion und Sektion keine Unterschiede zwischen den Genotypen auf, die dem Fehlen des *Slc10a5*-Gens hätten zugeordnet werden können. Es zeigten sich jedoch in dieser F2-Generation Unterschiede in der Fellfarbe durch die Aufspaltung der Allele der zwei Parentalstämme, wodurch genotypunabhängig weiße, braune und schwarze Mäuse auftraten (Abb. 5.1).

Um nicht direkt augenscheinliche Unterschiede zwischen den Mäusen doch sicher detektieren zu können, wurden diese, bevor weitere Untersuchungen durchgeführt wurden, bis auf Generation N7 auf den C57BL/6NTac-Hintergrund zurückgekreuzt. Dadurch sollten die interindividuellen Schwankungen verringert und verhindert werden, dass vom genetischen Hintergrund hergeleitete Unterschiede fälschlicherweise dem *Slc10a5*-Genotyp zugeordnet werden. Denn die verschiedenen Mausstämme können zum Teil erheblich verschiedene Phänotypen aufweisen. So wurden zwischen dem C57BL/6-Stamm und dem 129/Sv-Stamm in unterschiedlichen Forschungsgebieten Abweichungen gefunden, zum Beispiel im Verhalten, in der Cholesterinaufnahme und im Herz-Kreislauf-System (Jolley et al. 1999; Hartner et al. 2003; Abramov et al. 2008; Lu et al. 2012).

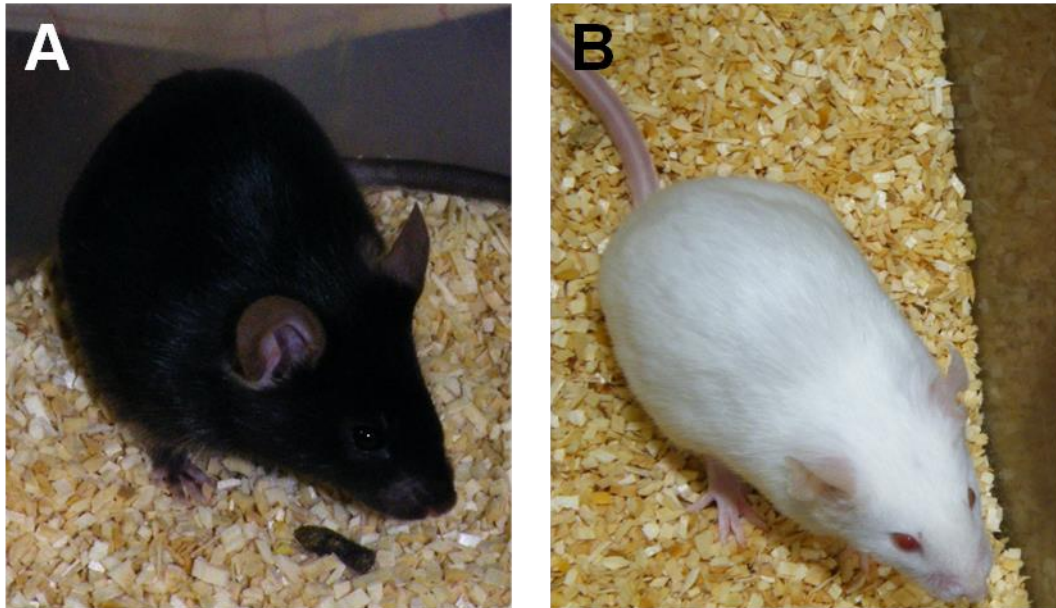


Abb. 5.1 Beispielhafte Tiere der F2-Generation: *Slc10a5*-Knockout- (A) und Wildtyp-Maus (B)

Durch Aufspaltung der Allele der Parentalstämme C57BL/6N und 129SvEvBrd entstehen aus der Anpaarung der F1-Hybride in der F2-Generation Mäuse mit verschiedenen Fellfarben. Diese Fellfärbung tritt unabhängig vom Genotyp auf. Sie ist jedoch beispielhaft für die zufällige Allelverteilung der Parentalstämme.

Ausgehend vom maximalen Heterozygotiegrad der F1-Hybriden kommt es bei weiterer Zucht zu einer Aufspaltung der Allele, sodass die Geschwistertiere eine zufällige Mischung von Allelen beider Mausstämmen tragen und deshalb nicht mehr vergleichbar sind (Wolfer et al. 2002). Dem wurde entgegengewirkt, indem durch die Rückkreuzung ein kongener Stamm angestrebt wurde, der dem C57BL/6NTac-Stamm bis auf den *Slc10a5*-flankierenden Locus entspricht.

Die in die Versuche eingesetzten inzipient kongenen *Slc10a5*-Knockout-Mäuse befanden sich in Generation N7 der Rückkreuzung und wiesen 99,4 bis 99,5 % Übereinstimmung mit dem C57BL/6NTac-Genom auf. Auch sie zeigten sich in der Adspektion und im beobachteten Verhalten unauffällig. Als einziger Unterschied stellte sich ein geringeres Gewicht dar, das bei den Wurfgeschwistern aber aufgrund des zu geringen Stichprobenumfangs nicht statistisch ausgewertet werden konnte. Das geringere Gewicht bestätigte sich jedoch auch im Vergleich zu altersgleichen C57BL/6NTac-Mäusen (siehe Abb. 4.28).

5.4 Gallestoffwechsel bei der *Slc10a5*-Knockout-Maus

Zur Aufklärung des Einflusses von SLC10A5 auf den Gallestoffwechsel *in vivo* wurden Galle und Plasma der Mäuse untersucht. Aufgrund der relativen phänotypischen Unauffälligkeit der *Slc10a5*-Knockout-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen wurde zusätzlich zur Probennahme

nach Standardhaltungsbedingungen Futter mit 0,5 % Gewichtsanteilen Cholsäure über sieben Tage gegeben. Hiermit sollte die möglicherweise vorhandene Fähigkeit zur Kompensation der fehlenden SLC10A5-Funktion überschritten werden und somit ein Phänotyp unter Provokation induziert werden. Es ist bekannt, dass viele Knockout-Mausstämme unter den optimalen Standardhaltungsbedingungen keinen Phänotyp aufweisen. Die *Lxr α* -Knockout-Maus hat beispielsweise bei normaler Haltung und Fütterung keinen abweichenden Phänotyp, sondern es kommt erst durch Diät mit erhöhtem Cholesterolgehalt zur Akkumulation von Cholesterol und klinischen Problemen (Peet et al. 1998). Auch die *Slc10a1*-Knockout-Maus zeigt mit ihrer normalen Fruchtbarkeit und Überlebensrate ohne anatomische Auffälligkeiten außer dem etwas geringeren Körpergewicht keinen besonderen Phänotyp. 60 bis 75 % der untersuchten Tiere haben zudem eine normale Gallensäureplasmakonzentration, die erst durch die Fütterung mit 0,1 % Ursodeoxycholsäure massiv ansteigt und so die durch Fehlen von NTCP reduzierte Transportkapazität für Gallensäuren in die Leber aufzeigt (Slijepcevic et al. 2015).

Wie aufgrund der fehlenden phänotypischen Abweichungen der *Slc10a5*-Knockout-Mäuse bereits vermutet, unterschied sich das Gallensäureprofil unter Standardbedingungen mit Kontrollfutter nicht von den Wildtyp-Mäusen (siehe 4.7.4). Die aufgestellte Hypothese, dass Kompensationsmechanismen auf Ebene der Transkription der in den Gallensäurestoffwechsel involvierten Gene den unauffälligen Phänotyp der Mäuse begründen, konnte in der Array-Analyse der Leberproben der im Versuch verwendeten Mäuse nicht bestätigt werden. So wurde keine deutliche Regulation dieser Gene gefunden (siehe Tab. 4.5, Abb. 4.37). Slijepcevic et al. vermuteten auch bei den *Slc10a1*-Knockout-Mäusen, dass die Tiere, die einen normalen Plasmagallensäurespiegel im Gegensatz zur Erhöhung bei ihren Geschwistern aufrechterhalten, andere Gallensäureaufnahme-transporter kompensatorisch hochregulieren. Die Genexpression von *Slc10a1*, *Slc10a4* und *Slc10b2* zeigte in diesen Tieren jedoch keine Unterschiede im Vergleich mit den Wildtypkontrollen. Eine abschließende Erklärung für die Aufrechterhaltung eines normalen Plasmagallensäurespiegels beim Großteil der *Slc10a1*-Knockout-Mäuse wurde auch hier nicht gefunden (Slijepcevic et al. 2015).

5.5 Pathologische Veränderungen nach Cholsäurefütterung

Während unter den Standardfütterungsbedingungen keine massiven Unterschiede zwischen den *Slc10a5*-Knockout- und den Wildtyp-Mäusen auszumachen waren, kam es durch die 0,5 % Cholsäure-haltige Fütterung zu Veränderungen am Dünndarm der Mäuse. Diese waren bei den Knockout-Mäusen wesentlich stärker ausgeprägt.

Die Literaturrecherche vor dem Tierversuch führte zu der Annahme, dass durch die 0,5 % Cholsäure im Futter keine gesundheitlichen Schäden an den Mäusen auftreten sollten. Eine Konzentration von 1 % Cholsäure im Futter wurde als zu hoch erachtet, da sie nur als nicht letal beschrieben wurde (Zhang et al. 2010). Bei 0,5 % Cholsäure im Futter wurden die Mäuse als gesund und aktiv bezeichnet (Wang et al. 2003b) oder keine gesundheitsschädlichen Effekte beobachtet (Pawlikowska et al. 2004). Oft wurden jedoch keine Aussagen zum Gesundheitszustand der Mäuse getroffen (Deeg 2003; Wang et al. 2003a; Miyata et al. 2005). Ab 0,3 % Cholsäure konnte bei C57BL/6 Mäusen ein Anstieg von Leberenzymen und Plasmagal-lensäurekonzentrationen als Indikator für beginnende Hepatotoxizität beobachtet werden, aber bis 1 % keine Todesfälle (Song et al. 2011).

In den Gallensäurefütterungsversuchen wurde von einem anfänglichen Gewichtsverlust berichtet, der sich in der zweiten Woche wieder ausglich (Wang et al. 2003b; Pawlikowska et al. 2004). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde ein leichter Gewichtsverlust bei beiden mit Cholsäure gefütterten Gruppen beobachtet, der sich bis zum Versuchsende nicht wieder ausglich (siehe Abb. 4.28). Dieser Effekt ließe sich durch eine verminderte Futteraufnahme durch eine bittere Geschmacksabweichung des Futters erklären. Leider wurde die Futteraufnahme mit dem verwendeten Versuchsdesign nicht überprüft. Am Tag der Gallenblasenkatheterisierung wiesen die Tiere aller Versuchsgruppen einen gut gefüllten Magen-Darm-Trakt auf, was zumindest eine stark verminderte Futteraufnahme ausschließen lässt. Eine weitere Erklärung könnte ein Einfluss auf den Energiestoffwechsel sein, der durch die Umstrukturierung des Gallensäurepools ausgelöst werden könnte. Tatsächlich gibt es enge Verknüpfungen zwischen Gallensäurepool, intestinaler Flora, Lipid- und Glucosestoffwechsel (Watanabe et al. 2006; Trauner et al. 2010; Tremaroli et al. 2012). Nach einer Woche Gallensäurefütterung soll sich der Gallensäurepool stabil umgestellt haben (Wang et al. 2003a), und die Mäuse gleichen den Gewichtsverlust wieder aus (Wang et al. 2003b; Pawlikowska et al. 2004). Demnach könnte sich auch bei der *Slc10a5*-Knockout- und Wildtyp-Maus das Gewicht wieder erhöhen, wenn sich der Mausstoffwechsel an die Veränderungen adaptiert hätte. Dies ist aber aufgrund der durchgeführten nur einwöchigen Fütterungsperiode nicht mehr zu überprüfen.

Außer der Gewichtsabnahme durch die Cholsäurefütterung wurde mit eventuell auftretendem Durchfall durch die erhöhte Konzentration von Gallensäuren im Dickdarm gerechnet. So hatten Pawlikowska et al (2004) eine zehnfach erhöhte Gallensäurekonzentration im Kot nach 0,5 % Cholsäurefütterung gemessen, aber leider keine Aussagen zum Kotabsatz der Mäuse gemacht. Beim Menschen sind wässrige Durchfälle durch Gallensäuremalabsorption beschrieben, die sich durch die prosekretorische Wirkung von Gallensäuren im Dickdarm begründen,

wobei besonders Deoxycholsäure die Chloridsekretion verstärkt (Chadwick et al. 1979; Field 1993; Keely et al. 2007; Hofmann 2009a). Somit wurde die nach drei bis fünf Tagen auftretende etwas weichere, aber noch geformte Kotkonsistenz bei 60 % der Knockout-Mäuse und 83 % der Wildtyp-Mäuse als schwaches Symptom dieser Hypersekretion angesehen.

Gallensäuren sind seit langem dafür bekannt, dass sie auch zytotoxische Wirkungen haben. Sie stehen im Verdacht, die Darmschleimhaut anzugreifen, die intestinale Permeabilität zu erhöhen und entzündliche Darmerkrankungen zu triggern. Es konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass sich die Ausprägung von durch Dextran-Natriumsulfat induzierter Colitis verschlimmert, wenn durch Fischöl-haltige Diät (60 % Fett, 27,2 % Menhaden-Öl) der Deoxycholatgehalt und damit die Hydrophobizität der fäkalen Gallensäuren zunimmt (Stenman et al. 2013b). Leider konzentrierten sich die durchgeführten Studien vor allem auf durch Deoxycholat erhöhte intestinale Permeabilität insbesondere im Dickdarm. Als Pathomechanismus wird eine erhöhte parazelluläre Durchlässigkeit des Darmepithels bei nicht-entzündlicher Genese favorisiert (Goerg et al. 1983; Fasano et al. 1990; Sun et al. 2004; Stenman et al. 2012; Stenman et al. 2013a; Stenman et al. 2013b).

Untersuchungen zur Wirkung von Cholat auf die Permeabilität und die Durchblutung des Dünndarms konnten nicht gefunden werden. Allerdings wurde am Kaninchencolon gezeigt, dass nur α -Dihydroxygallensäuren (Deoxycholat, Chenodeoxycholat) auf die Schleimhautmorphologie und Permeabilität negative Auswirkungen hatten. Durch Ändern der OH-Substituenten in die β -Konformation oder durch Trihydroxygallensäuren – wie Cholat – ließen sich diese Effekte nicht auslösen (Chadwick et al. 1979). Somit kann nur spekuliert werden, ob auch Cholat als schwach hydrophobe Gallensäure in hohen Konzentrationen in der Lage ist, die Darmschleimhaut zu verändern, zumal die Dünndarmschleimhaut besser an höhere Gallensäurekonzentrationen adaptiert ist als die Dickdarmschleimhaut.

Die Sektion der Mäuse nach der Gallenblasenkatheterisierung zeigte hingegen keine Auffälligkeiten am Dickdarm, und die Kotkonsistenz hatte sich, wie schon klinisch beobachtet, wieder vollständig normalisiert. Die durch die Cholsäurefütterung aufgetretenen Veränderungen im Dünndarm traten völlig unerwartet auf. Dabei zeigten alle mit Cholsäure gefütterten Mäuse Rötungen im proximalen Abschnitt des Duodenums, die bei den Knockout-Mäusen aber stärker ausgeprägt waren und bis weiter distal reichten (siehe Abb. 4.29). Auch wenn diese Veränderungen makroskopisch durch die Schwellung und Rötung nach einem Entzündungsgeschehen und einer massiven Veränderung der Darmwand aussahen, zeigte sich in der histologischen Untersuchung nicht das erwartete Bild. Es konnte keine Infiltration mit Entzündungszellen beobachtet werden, jedoch waren eine leichte Hyperämie bei den Wildtyp-

Mäusen und starke Ansammlungen von Erythrozyten auch außerhalb der Gefäße bei den Knockout-Mäusen erkennbar (siehe Abb. 4.31). Leider waren die Darmzotten durch autolytische Prozesse schon in Mitleidenschaft gezogen worden, obwohl die Organe schnellstmöglich nach dem Tod entnommen und bei 4 °C in PFA fixiert wurden. Anzumerken sei hier, dass bei zwei oder vierzehn Tage alten Ratten nur Darmgewebe, das innerhalb von weniger als 15 min präpariert und fixiert wurde, keine postmortalen Veränderungen zeigte (Scheifele et al. 1987), sodass autolytische Prozesse bei einer Sektion ohne Perfusionsfixierung schwer vermeidbar sind, wenn umfängliche Untersuchungen vorgenommen werden sollen. Nach 30 min konnten bereits Exfoliation und Lyse der Epithelzellen beobachtet werden, die von den Spitzen der Zotten nach basal fortschritten (Scheifele et al. 1987). Entsprechend zeigten sich auch die Veränderungen in den hier angefertigten Dünndarmschnitten der Mäuse. Dadurch kann leider nicht mehr geklärt werden, ob das Austreten von Blutzellen aus den Gefäßen prä- oder postmortal stattgefunden hat. Jedoch kann man im direkten Vergleich mit der Wildtyp-Maus die wesentlich stärkeren Veränderungen bei der Knockout-Maus durch die Cholsäurefütterung auch histologisch beobachten. Durch die vermehrte Durchblutung und eventuell auch vorhandene Durchlässigkeit der Darmgefäße kann die Aufnahme von Cholsäure aus dem Dünndarm erhöht sein beziehungsweise umgekehrt die vermehrte Aufnahme der Cholsäure die Symptome hervorgerufen haben.

5.6 Gallensäurepool der *Slc10a5*-Knockout- und der Wildtyp-Mäuse

Bei Kontrollfütterung zeigten die *Slc10a5*-Knockout-Mäuse keine Abweichungen in der ausgeschiedenen Gallenmenge und der Konzentration der Gallensäuren. Durch die 0,5 % Cholsäurefütterung verdreifachte sich die ausgeschiedene Gallenmenge, und auch die Gesamtkonzentration der Gallensäuren erhöhte sich auf mehr als das Dreifache. Auch in diesem Punkt unterschieden sich die beiden Genotypen nicht voneinander. Auf die Gabe der Cholsäure hin änderte sich die Zusammensetzung des Gallensäurepools der *Slc10a5*-Knockout- und Wildtyp-Mäuse aber abweichend. Die Wildtyp-Mäuse reagierten auf die zusätzliche Cholsäure wie bereits in der Literatur beschrieben durch eine Zunahme von den aus Cholsäure hergeleiteten Gallensäuren Cholat und Deoxycholat in konjugierter und unkonjugierter Form, während Chenodeoxycholat und Muricholate abnahmen (siehe Abb. 4.35) (Wang et al. 2003a; Zhang et al. 2010; Song et al. 2011). Die Zusammensetzung der Gallensäuren änderte sich bei den Knockout-Mäusen in ähnlicher Art und Weise. Jedoch konjugierten die Wildtypen alle Gallensäuren fast vollständig, bevor diese in die Galle ausgeschieden wurden, während ungefähr

ein Drittel der Gallensäuren bei den Knockout-Mäusen unkonjugiert ausgeschieden wurden. Weiterhin unterschieden sich die sekundären Gallensäuren zwischen den Genotypen.

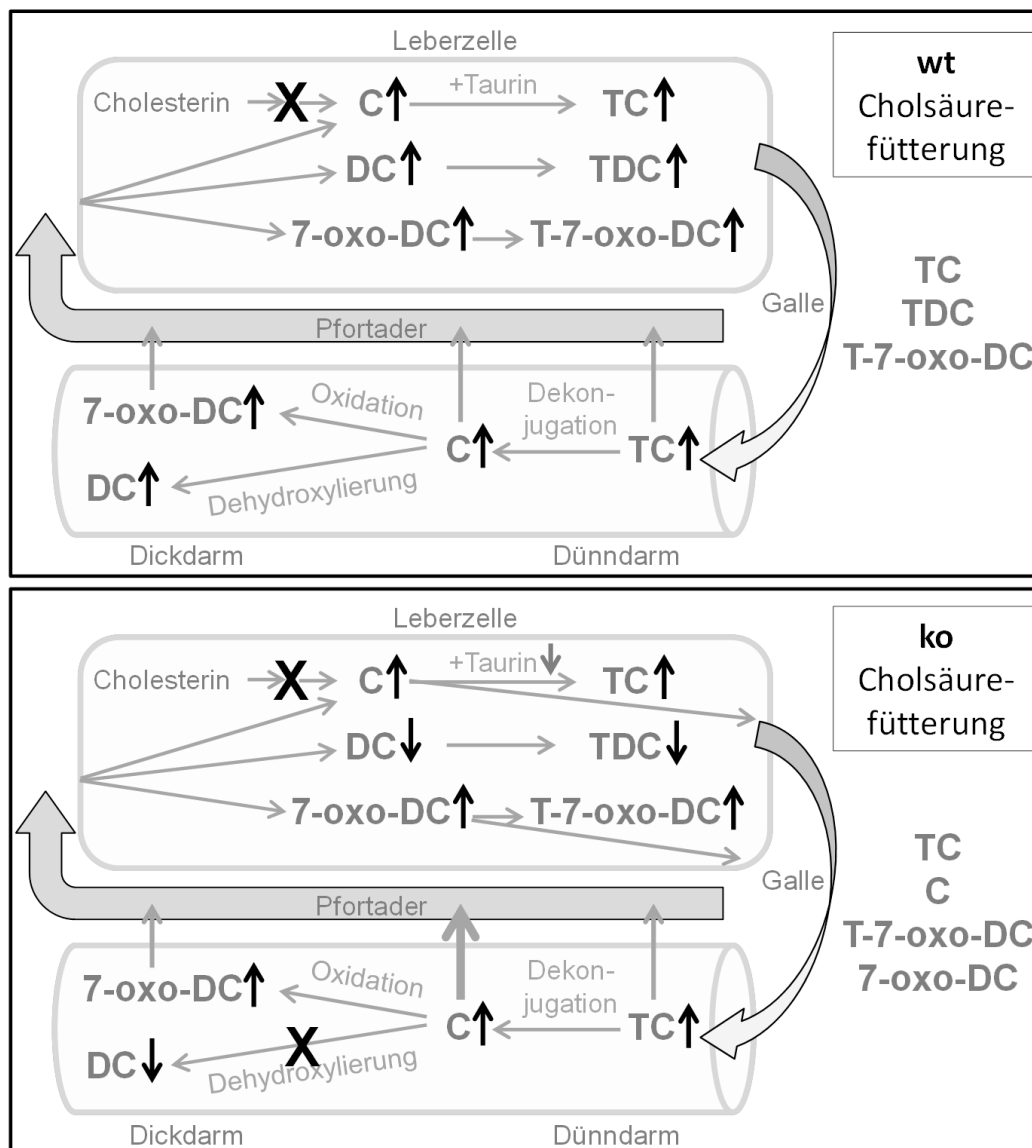


Abb. 5.2 Veränderungen im Gallensäurepool der *Slc10a5*-Knockout- und Wildtyp-Mäuse durch die 0,5 % Cholsäurefütterung

Wildtypmaus: Durch die 0,5 % Cholsäurefütterung gelangt vermehrt Cholsäure in den Dünndarm, diese wird zum Teil unverändert resorbiert oder durch bakterielle Enzyme in die sekundären Gallensäuren 7-oxo-Deoxycholsäure und Deoxycholsäure umgewandelt, welche im Dickdarm passiv resorbiert werden. Die über die Pfortader zur Leber gelangenden Gallensäuren werden in die Leberzellen transportiert und dort nahezu vollständig mit Taurin konjugiert und danach in die Galle ausgeschieden. Die Gallensäureneusynthese wird stark herabreguliert. Im Ileum werden die konjugierten Gallensäuren aktiv reabsorbiert. Quantitativ bestimmend für den Gallensäurepool sind somit Taurocholsäure > Taurodeoxycholsäure > Tauro-7-oxo-Deoxycholsäure.

Knockoutmaus: Die durch die Fütterung aufgenommene Cholsäure wird vermehrt im Dünndarm passiv resorbiert und bakteriell zu 7-oxo-Deoxycholsäure oxidiert, jedoch kaum zu Deoxycholsäure dehydroxyliert. In den Leberzellen werden die Gallensäuren zum Teil mit Taurin konjugiert, aber auch unkonjugiert in die Galle ausgeschieden. Die Gallensäureneusynthese ist stark vermindert. Quantitativ bestimmend für den Gallensäurepool sind somit Taurocholsäure > Cholsäure > Tauro-7-oxo-Deoxycholsäure > 7-oxo-Deoxycholsäure.

5.7 Unterschiede im Spektrum der sekundären Gallensäuren

Durch die Cholsäurefütterung wich das Gallensäurespektrum der Knockout-Mäuse von dem der Wildtyp-Mäuse ab. Machte Taurodeoxycholat ungefähr ein Viertel ($23,9 \pm 4,9 \%$) der Gesamtkonzentration bei den Wildtyp-Mäusen aus, verminderte sich der Anteil bei den Knockout-Mäusen durch die Cholsäurefütterung sogar noch auf unter 1% ($0,6 \pm 0,3 \%$). Bei den kontrollgefütterten Tieren wies Taurodeoxycholat mit einem Anteil von $4,7 \pm 3,0 \%$ (ko) und $6,9 \pm 3,5 \%$ (wt) keine signifikanten Unterschiede auf. Im Gegensatz zu anderen Gallensäuren stieg der Anteil an unkonjugiertem Deoxycholat in den Knockout-Mäusen ebenso wenig an wie in den Wildtypen. Auch die Gehalte an 7-oxo-Deoxycholat wichen zwischen den beiden Genotypen voneinander ab. Der Anteil von Tauro-7-oxo-Deoxycholat in den Wildtyp-Mäusen blieb unabhängig von der Cholsäurefütterung konstant bei $13,8 \pm 0,6 \%$ und $13,3 \pm 0,5 \%$, während der der Knockout-Mäuse von $14,5 \pm 0,6 \%$ auf $10,9 \pm 0,9 \%$ sank. Allerdings stieg der Anteil von unkonjugiertem 7-oxo-Deoxycholat von wesentlich unter 1% auf $8,4 \pm 1,1 \%$ in den mit Cholsäure gefütterten Knockout-Mäusen, sodass sich der Gesamtanteil dieses Gallensäuremetabolits erhöhte (siehe Abb. 4.35 und Tab. 4.3).

Insgesamt wiesen die mit Cholsäure gefütterten Wildtyp-Mäuse einen höheren Anteil an sekundären Gallensäuren auf als die Knockout-Mäuse. Der Gehalt von 7-oxo-Deoxycholat kann schwer mit Literaturwerten verglichen werden, da er selten bestimmt wurde. In seinen Gallensäurefütterungsversuchen an C57BL/6 Mäusen konnten Zhang et al. (2010) es im Lebergewebe der männlichen Kontrolltiere mit $5,1 \pm 1,0 \text{ nmol/g Leber}$ ($\cong 2 \%$) und $1,2 \pm 0,3$ ($\cong 0,3 \%$) nach 1% Cholsäurefütterung nachweisen.

In der Literatur werden unterschiedliche Werte für Taurodeoxycholat in der Galle angegeben. So maßen Alnouti et al. (2008) in der Galle der untersuchten C57BL/6Crl Mäuse nur $0,9 \pm 0,2 \%$ Taurodeoxycholat, während Wang et al. (2003a) $3,4 \pm 1,3 \%$ bei Standardfütterung und $8,4 \pm 2,0$ nach einwöchiger $0,5 \%$ Cholsäurefütterung bei C57L/J feststellte. Bei vielen Studien wurden die Konzentrationen der Gallensäuren im Lebergewebe gemessen, welche jedoch nicht direkt mit denen der Galle verglichen werden können. Hierbei lagen die Werte bei $4,4 \pm 1,6 \%$ (Alnouti et al. 2008), $3,2 \%$ (10% nach 1% -Cholsäurefütterung) (Zhang et al. 2010) und $15,3 \pm 10,3 \%$ ($10,4 \pm 1 \%$ nach 1% -Cholsäurefütterung) (Zollner et al. 2006b). Obwohl also in fast allen angegebenen Studien zumindest C57BL/6-Stämme (C57L/J, C57BL/6Crl, C57BL/6J) und nur männliche Individuen verwendet wurden, scheint es eine große Streuung in der Konzentration von Taurodeoxycholat zu geben. Umso wichtiger ist es, die Ergebnisse im Bezug zu den Kontrollen zu betrachten.

Bereits Russel und Burch haben neben den Begriffen Genotyp und Phänotyp den Ausdruck Dramatyp geprägt. Während Umweltfaktoren während der Entwicklung zusätzlich zum Genotyp die Ausprägung des Phänotyps bestimmen, wird der Dramatyp durch unmittelbare Faktoren beeinflusst und stellt eine kurzfristige Reaktion auf bestimmte Umweltfaktoren dar (Russel et al. 1959). Somit ist neben der genetischen Determinierung und Überwachung auch die Standardisierung der Umweltbedingungen für die Mäuse wichtig. Dies wurde durch Rückkreuzung der Mäuse auf den C57BL/6N-Hintergrund und Adaptation an das Versuchskontrollfutter, welches außerdem in der Zusammensetzung dem Haltungsfutter entsprach, berücksichtigt. Einflüsse der Haltungsumgebung wurden durch die gleichzeitige Versuchsdurchführung für alle Versuchsgruppen minimiert.

Zusätzlich zu äußeren Umwelteinflüssen kann die intestinale bakterielle Flora den Dramatyp beeinflussen, wie sich mit der Etablierung von gnotobiotischen, also keimfreien, Mauslinien, zeigte. Gnotobiotische Mäuse zeigen zahlreiche Abweichungen gegenüber konventionell gehaltenen Mäusen. Das auftretende vergrößerte Cäcum kann durch Assoziierung der Tiere mit physiologischen Bakterien normalisiert werden. Dennoch können sich verschiedene Kolonien und vor allem SPF von konventionell gehaltenen Mäusen in zahlreichen Aspekten – etwa Immunsystem, Karzinogenese und Genexpression – unterscheiden und die Ergebnisse von Experimenten beeinflussen, wenn ihre bakterielle Flora differiert (Itoh et al. 2005). Nicht verwunderlich sind auch die Ergebnisse von Koopman et al. (1984), die zeigten, dass durch Inokulation mit steigenden Konzentrationen cäcaler Bakterien in keimfreie Mäuse der Anteil sekundärer Gallensäuren im Kot steigt. Die Mikroflora von Mäusen unterscheidet sich auch zusätzlich zu Stammunterschieden je nachdem, von welchem Züchter und aus welcher Zuchteinheit die Mäuse bezogen werden. Bei IVC-Haltung entwickelte sich zwar die Flora altersabhängig, ließ sich aber weiterhin auf die Herkunft der Tiere beziehen. Die Flora der Nachkommen wurde dabei durch die Mutter determiniert (Ericsson et al. 2015).

Variationen und Unterschiede in der Darmflora können bei den verwendeten Mäusen nicht ausgeschlossen werden. Die *Slc10a5*-Knockout-Mäuse stammten aus eigener Nachzucht, die C57BL/6NTac-Wildtypiere wurden zugekauft. Allerdings wurden während der Zucht der *Slc10a5*-Knockout-Mäuse die für die Rückkreuzung verwendeten C57BL/6NTac-Muttertiere vom selben Züchter bezogen, sodass über mehrere Generationen die Darmbakterien von den Muttertieren auf die Jungtiere weitergegeben wurden. Die C57BL/6NTac-Mäuse wurden bereits im Alter von drei bis vier Wochen zugekauft und zwei Monate vor dem Versuch im selben Raum wie die *Slc10a5*-Knockout-Mäuse in offenen Käfigen gehalten. Auch dem Einfluss der Futterzusammensetzung auf die Darmflora wurde durch die lange Adaptation der Tiere vor

dem Versuch an dasselbe Futter Rechnung getragen. Bei Kontrollfütterung traten zudem keine Unterschiede zwischen den Genotypen auf, die auf eine abweichende Flora hindeuteten. Unterschiede im Gallensäurespektrum können neben dem verwendeten Mausstamm und den Haltungsbedingungen sogar durch den Probenahmezeitpunkt bedingt werden. Denn auch der Gallensäuremetabolismus unterliegt einer circadianen Regulation (Zhang et al. 2011). Dieser Regulation wurde im durchgeführten Versuch Rechnung getragen, indem die Gallenblasenkatheterisierung immer morgens durchgeführt wurde.

5.7.1 Mögliche Gründe für das abweichende Spektrum sekundärer Gallensäuren bei der *Slc10a5*-Knockout-Maus

Hypothesen für die nach 0,5 % Cholsäurefütterung aufgetretenen Abweichungen des Spektrums der sekundären Gallensäuren der *Slc10a5*-Knockout-Mäuse

1. Deoxycholat wird zwar von den intestinalen Bakterien gebildet, aber nicht mehr in den Körper aufgenommen.
2. Deoxycholat wird bei den Knockout-Mäusen fast vollständig zu Cholat rehydroxyliert und kann nicht akkumulieren.
3. Bei den Knockout-Mäusen kommen vermehrt Bakterien mit 7α -HSDH-Aktivität, aber vermindert Bakterien mit $7\alpha/\beta$ -Dehydroxylaseaktivität vor.
4. Durch ein verändertes Mikroklima im Dickdarm führen die Bakterien, die eine universelle Enzymausstattung haben, eher die C7-Oxidierung als die mehrschrittige Hydroxylierung durch.
5. Die Cholsäure gelangt nicht mehr in den Dickdarm, da sie aktiv stärker aufgenommen wird oder die Dünndarmschleimhaut eine erhöhte Permeabilität aufweist. Somit können nur die Bakterien im terminalen Dünndarm ihre Aktivität entfalten.
6. Unterschiede im Verhältnis von konjugierten zu unkonjugierten Gallensäuren beeinflussen die Bildung und/oder die Aufnahme von sekundären Gallensäuren.

Deoxycholat wird im Dickdarm aufgrund seiner Hydrophobizität passiv aufgenommen (Dietschy 1968; Schiff et al. 1972; Hofmann et al. 2008), sodass ein vollständiges Ausscheiden ohne Absorption sehr unwahrscheinlich ist, zumal die kontrollgefütterten Knockout-Mäuse durchaus Deoxycholat in Form von Taurodeoxycholat in ihrem Gallensäurepool besit-

zen. Auch eine vollständige Rehydroxylierung in der Leber zu Cholat, insbesondere bei vorhandenem massiven Cholatüberschuss, erscheint unwahrscheinlich.

Mit Inokulationsexperimenten an gnotobiotischen Mäusen von zuvor *in vitro* auf ihre Metabolismuseigenschaften getesteten Bakterien konnten auch *in vivo* bestimmte Spezies – vor allem zur Gattung *Bacteroides* gehörend – ausgemacht werden, die nur Gallensäuren dekonjugieren, aber keine 7 α -Dehydroxylierung durchführen und somit kein Deoxycholat bilden. Einige, aber nicht alle, dieser Stämme sind in der Lage, 7-oxo-Deoxycholat zu bilden. Die Fähigkeit zur 7 α -Dehydroxylierung zeigten in diesem Experiment nur bestimmte Chlostridien, die anteilig an der Bakterienflora schwach repräsentiert waren. Für die Bildung von 7-oxo-DC konnten auch nicht näher klassifizierte Chlostridien detektiert werden. Generell änderte sich je nachdem, in welcher Kombination die Bakterien verabreicht wurden, die Zusammensetzung der sekundären Gallensäuren, welche im Cäcuminhalt bestimmt wurden (Narushima et al. 1999a; Narushima et al. 2006).

Diese Studien zeigen also, dass tatsächlich eine Verschiebung der bakteriellen Flora zu Änderungen in Menge und Anteilen von sekundären Gallensäuren führen können, und unterstützen somit die dritte Hypothese. Da die Bildung von oxo-Gallensäuren durch Sauerstoff erhöht werden kann – wie *in vitro* untersucht wurde – und vermutet wird, dass diese Reaktionen in Bakterien nahe der Mukosaoberfläche ablaufen (Sutherland et al. 1982; Wilson 2005), könnte eine stärkere Durchblutung der Schleimhaut zu einer Zunahme von oxo-Gallensäuren führen. Eine Schleimhauthyperämie wurde besonders im Dünndarm der mit Cholsäure gefütterten Knockout-Mäuse gesehen. Dies könnte den Anstieg des 7-oxo-Deoxycholats in den Knockout-Mäusen erklären. Allerdings liefert es keine Erklärung für das Fehlen von Deoxycholat. Als Erklärung hierfür erscheint die fünfte Hypothese geeignet. Wenn das Cholat schon im Dünndarm passiv absorbiert wird, können die bereits im Dünndarm vorhandenen Bakterien das Cholat an C7 oxidieren. Da die 7 α -Dehydroxylierung erst im Dickdarm stattfindet, steht den Bakterien dort nicht mehr genügend Substrat zur Verfügung.

Bei der Maus müssten unkonjugierte Gallensäuren gut passiv resorbiert werden können, denn durch den niedrigen pH-Wert im Darm der Maus zwischen pH 4 und pH 5 verschiebt sich bei unkonjugierten Gallensäuren wie Cholat (pKs-Wert 5) das Gleichgewicht zur nicht ionisierten Form (Cabral et al. 1986; McConnell et al. 2008). Ob und warum die Aufnahme von Cholat bei den Knockout-Mäusen höher ist, lässt sich leider anhand der vorhandenen Daten nicht mehr klären. Weiterhin stellt sich noch die Frage, ob primär die Durchblutungssteigerung eingesetzt hat und daraufhin mehr Cholat absorbiert wurde oder durch die vermehrte Gallensäureresorption die vermehrte Durchblutung ausgelöst wurde.

Eine interessante Parallele zu den *Slc27a5*-Knockout-Mäusen zeigt sich nicht nur in deren fehlender Gallensäurerekonjugation (siehe 5.9.3). Ihr Profil der sekundären Gallensäuren wich von dem der Wildtypen ab, obwohl die Tiere aus denselben Würfen stammten, also dieselbe Mikroflora besitzen sollten. Die *Slc27a5*-Knockout-Mäuse wiesen anders als die Wildtypkontrolltiere in der Galle keine Taurodeoxycholsäure und Taurohyodeoxycholsäure auf, was beweist, dass sie rezirkulierende sekundäre Gallensäuren nicht konjugieren können. Allerdings kam es auch nicht zu einem Anstieg der unkonjugierten Formen, sodass diese beiden sekundären Gallensäuren quasi nicht in der Galle nachzuweisen waren. Die Autoren spekulieren, dass die unkonjugierten Gallensäuren schneller rehydroxyliert werden oder schlechter in die Leber aufgenommen werden als die konjugierten (Hubbard et al. 2006). Leider wurden diese potenziellen Begründungen von den Autoren nicht weiter untersucht. Diese Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass das Verhältnis von unkonjugierten zu konjugierten Gallensäuren einen Einfluss auf das Spektrum sekundärer Gallensäuren haben könnte.

5.8 Unterschiede im Anteil unkonjugierter Gallensäuren

Wenn im Dünndarm der *Slc10a5*-Knockout-Mäuse bei Cholsäurefütterung mehr Cholsäure resorbiert wird als bei den Wildtyp-Mäusen, könnte dies bereits den alleinigen Auslöser für die vermehrte Ausscheidung unkonjugierter Gallensäuren darstellen, weil die absolute Grenze der Konjugationskapazität der Leber erreicht wird. Dagegen spricht jedoch, dass bei den mit Cholsäure gefütterten Mäusen beider Genotypen sowohl die Konzentration als auch die pro 30 Minuten ausgeschiedene Menge der Gesamtgallensäuren in der Galle nicht unterschiedlich waren. Trotz des erhöhten Gallensäureangebots in der Leber blieb der Anteil der unkonjugierten Gallensäuren in den Wildtypen verschwindend gering. Bei Standardhaltungsfutter waren nur $0,3 \pm 0,1$ % bzw. $0,6 \pm 0,2$ % der Gallensäuren der Knockout- und der Wildtyp-Mäuse unkonjugiert. Dieser Prozentsatz stieg durch Fütterung mit 0,5 % Cholsäure bei den Wildtypen nicht signifikant an auf $1,8 \pm 2,6$ %, bei den Knockout-Mäusen hingegen auf $37,6 \pm 5,2$ % der Gesamtgallensäuren. Die Wildtyp-Mäuse waren im Gegensatz zu den Knockout-Mäusen also in der Lage, die Gallensäuren fast vollständig zu konjugieren, und schieden kaum unkonjugierte Gallensäuren in die Galle aus. Eine Ausnahme stellte eine der mit Cholsäure gefütterten Wildtyp-Mäuse dar, die mit 6,4 % erhöhte Werte an unkonjugierten Gallensäuren aufwies. Dieser Wert korrelierte mit der niedrigsten in der Real-Time-PCR gemessenen *Slc10a5*-Expression der Leber innerhalb der Versuchsgruppe und betrug nur ein Viertel der nächsthöheren Expression (siehe Abb. 4.39). Ob die verminderte Konjugationsrate bei dieser Maus

ursächlich mit der verminderten *Slc10a5*-Expression zusammenhängt, kann nachträglich nicht mehr untersucht werden, jedoch stellt es einen interessanten Befund dar.

Eine weitere Begründung für eine unterschiedliche Konjugationsrate könnte sein, dass manche Gallensäuren effektiver konjugiert werden können als andere. Allerdings schieden die Wildtypen mehr – wenn auch nicht signifikant mehr – Taurocholat aus, obwohl die Gesamtmenge an Cholat bei ihnen geringer war. Umgekehrt war die Konzentration von unkonjugiertem und konjugiertem Cholat zusammengenommen in der Galle der Knockout-Mäuse höher als bei den Wildtyp-Mäusen und trotzdem der konjugierte Anteil geringer. Also schien, auch wenn man nur Cholat betrachtet, die Konjugationsfähigkeit der Wildtypen höher bzw. die der Knockout-Maus eingeschränkt zu sein. Zusätzlich konjugierten die Wildtypen auch annähernd vollständig das anfallende Deoxycholat und das 7-oxo-Deoxycholat. Obwohl die Knockout-Mäuse wesentlich mehr 7-oxo-Deoxycholat ausschieden, ist die Menge des konjugierten Tauro-7-oxo-Deoxycholats in den Wildtypen tendenziell, wenn auch nicht signifikant, höher. Das unterschiedliche Spektrum der zu konjugierenden Gallensäuren mit einem erhöhten Anteil von Cholat bei den Knockout-Mäusen sollte demnach nicht für das Konjugationsdefizit verantwortlich sein.

Wie in Kapitel 5.7 bereits diskutiert, wiesen die mit Cholsäure gefütterten *Slc10a5*-Knockout-Mäuse nur geringe Deoxycholatkonzentrationen auf. Somit bestünde die Möglichkeit, dass Deoxycholat benötigt wird, um die Konjugation zu stimulieren. Gnotobiotische Mäuse, die aufgrund der fehlenden Darmflora keine sekundären Gallensäuren bilden und demnach kein Deoxycholat in der enterohepatischen Zirkulation besitzen, weisen aber in ihrem Cäcum nur konjugierte Gallensäuren auf (Narushima et al. 1999a). In einer anderen Untersuchung wurde die Zusammensetzung der cäcalen Gallensäuren bei Gnotobioten bestimmt, welche hauptsächlich aus Taurocholat und Tauro- β -Muricholat bestand (Hsiao et al. 2014). Demnach scheint Deoxycholat nicht für eine effektive Taurinkonjugation benötigt zu werden. Unterstützt wird diese Aussage durch *In-vitro*-Versuchsergebnisse, in denen gezeigt wurde, dass die Aktivierung von Cholat mit Coenzym A durch FATP5, was Voraussetzung für eine nachfolgende Konjugation ist, ohne Anwesenheit von Deoxycholat katalysiert wird (Mihalik et al. 2002).

Wieso wird die verminderte Fähigkeit zu konjugieren jedoch nicht unter Standardhaltungsdiät beobachtet? Unter physiologischen Bedingungen muss durch die effiziente enterohepatische Rezirkulation immer nur ein sehr kleiner Anteil an *de novo* synthetisierten oder im Darm dekonjugierten Gallensäuren konjugiert werden. Denn ASBT transportiert sehr effektiv die konjugierten Gallensäuren aus dem Darmlumen in die Enterozyten, obwohl er auch unkonjugierte

Gallensäuren transportieren kann (Wong et al. 1994; Craddock et al. 1998; Kramer et al. 1999). Der um 80 % verminderte Gallensäurepool bei der *Asbt*-Knockout-Maus zeigt, wie effektiv diese Rückresorption ist (Dawson et al. 2003). Durch die Fütterung mit 0,5 % Cholsäure wird jedoch kontinuierlich eine unkonjugierte Gallensäure im Überschuss zugeführt, sodass ein großer Anteil der Gallensäuren bei jedem Passieren der Leber neu konjugiert werden muss. Dabei fällt auch bei der *Slc10a5*-Knockout-Maus die Konjugation nicht vollständig aus, sondern es erscheint, dass deren Konjugationskapazität überschritten wird.

5.9 Mögliche Gründe für eine defiziente Konjugation bei der *Slc10a5*-Knockout-Maus

Bei der Konjugation der Gallensäuren muss zwischen der Konjugation der *de novo* synthetisierten Gallensäuren und der der recycelten Gallensäuren unterschieden werden. Bei den *de novo* synthetisierten Gallensäuren werden bereits die C27-Gallensäuren mit CoenzymA aktiviert, und die Kürzung der Seitenkette findet wie bei den Fettsäuren über β -Oxidation statt. Im letzten Schritt kann dann die entstandene CoA-gekoppelte C24-Gallensäure durch die BAAT mit Taurin oder Glycin konjugiert werden, wobei das CoA energiebringend abgespalten wird (Russell 2003; Pellicoro et al. 2007; Hofmann et al. 2008). Auch die durch den enterohepatischen Kreislauf wieder zur Leber gelangten dekonjugierten Gallensäuren müssen mit CoenzymA aktiviert und danach über die BAAT konjugiert werden. Hierfür werden in der Literatur verschiedene Möglichkeiten genannt.

Strittig ist hierbei, welches Enzym und in welcher subzellulären Lokalisation die Reaktion der Gallensäure mit CoenzymA katalysiert und in welchem Kompartiment die Konjugation mit Taurin/Glycin stattfindet. Die eine Gruppe von Forschern geht von einer rein peroxisomalen Lokalisation der BAAT aus. Diese stellt sich den Vorgang so vor, dass die zu rekonjugierenden Gallensäuren durch FATP5 CoenzymA gekoppelt werden und dann über unbekannte Transportmechanismen in das Peroxisom transportiert werden. Dort würden sie mit Hilfe der BAAT konjugiert werden und über unbekannte Transporter in das Zytoplasma transportiert werden (Pellicoro et al. 2007; Rembacz et al. 2010). Andere Untersuchungen konnten sowohl im Peroxisom als auch im Zytoplasma eine BAAT-Aktivität nachweisen (Solaas et al. 2004; Styles et al. 2007). Dementsprechend wird die Möglichkeit favorisiert, dass zu rekonjugierende Gallensäuren nicht wie die *de novo* synthetisierten im Peroxisom konjugiert werden, sondern nach der durch FATP5 katalysierten CoA-Aktivierung durch die BAAT im Zytoplasma. Über die Lokalisation von FATP5 herrscht ebenfalls Uneinigkeit. Mihalik et al. zeigten eine Expression des Proteins im Endoplasmatischen Retikulum, während Doege et al. es in He-

patozyten in der Plasmamembran nachwiesen (Mihalik et al. 2002; Doege et al. 2006a). Die CoA-Kopplung der Gallensäure könnte demnach im Zytoplasma an der Zellmembran (Doege et al. 2006a), dem Endoplasmatischen Retikulum (Mihalik et al. 2002) oder im Inneren des Endoplasmatischen Retikulums (Solaas et al. 2000) erfolgen.

Fest steht mit Sicherheit, dass das Fehlen des SLC10A5-Proteins keinen Einfluss auf das Gallensäurespektrum und die Konjugationsfähigkeit unter den Standardhaltungsbedingungen für Labormäuse hat. Die *De-novo*-Synthese scheint somit unter den Standardfütterungsbedingungen nicht beeinträchtigt zu sein. Durch die Fütterung mit Cholsäurezusatz wird die Neusynthese so stark herunterreguliert, dass der gesehene Überschuss an unkonjugierten Gallensäuren aus den recycelten Gallensäuren kommen muss. Deswegen soll im Folgenden diskutiert werden, welche Gründe zu einer mangelnden Konjugation der zur Leber rezirkulierenden Gallensäuren führen können.

Hypothesen für das Konjugationsdefizit der *Slc10a5*-Knockout-Mäuse

1. Es besteht ein Mangel an CoenzymA oder Taurin in den Leberzellen.
2. Es herrscht ein Mangel an den für die Konjugationsreaktion benötigten Enzymen.
3. Bestimmte Faktoren hemmen die an der Konjugationsreaktion beteiligten Enzyme, oder CoenzymA wird von den aktivierten Gallensäuren wieder abgespalten.
4. Die unkonjugierten Gallensäuren erreichen nicht den Ort ihrer CoenzymA-Kopplung oder der Taurinkonjugation.
5. Das Produkt wird nicht abtransportiert, und der Rückstau hemmt die Synthese.

5.9.1 CoenzymA-Mangel

Eine wichtige Voraussetzung für die Taurinkonjugation ist, dass ausreichend CoenzymA für die vorangehende Aktivierung der Gallensäuren vorhanden ist. CoenzymA wird über fünf Schritte im Zytoplasma synthetisiert und kommt neben dem Zytoplasma in hohen Konzentrationen in Mitochondrien und Peroxisomen vor (Leonardi et al. 2005). Die an der Synthese beteiligten Enzyme Pantothenatkinase, Phosphopantothenoylcystein-Synthetase, Phosphopantothenoylcystein-Decarboxylase, Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase und CoenzymA-Synthase wurden bei *Slc10a5*-Knockout- und Wildtyp-Mäusen beider Fütterungsarten konstant exprimiert (Daten nicht gezeigt). Es deutet also nichts auf ein generelles Defizit der CoenzymA-Bildung in den Knockout-Mäusen hin, zumal dies auch durch schwere phänotypische Abweichungen auffallen sollte, da CoenzymA essentiell für eine Vielzahl an

Stoffwechselprozessen ist. Da die CoenzymA-Level auf Zellniveau und in den einzelnen Zellkompartimenten jedoch nicht bestimmt wurden, lässt sich über Abweichungen hier keine Aussage treffen.

5.9.2 Taurinmangel

Betrachtet man den Vorgang aus einem anderen Blickwinkel, könnte nicht nur ein Fehlen der aktivierten Gallensäure oder eine Anhäufung des Produkts zu einer mangelnden Taurinkonjugation führen, sondern auch ein Mangel an Taurin. Taurin kann über den Na⁺-abhängigen Taurintransporter (TAUT, *Slc6a6*) ubiquitär in Zellen aufgenommen werden. Zusätzlich sind einige Zelltypen – etwa die Hepatozyten – in der Lage, Taurin über die Cystein Sulfinat Decarboxylase (CSAD, *Csad*) zu bilden. *Slc6a6*-Knockout-Mäuse zeigen einen um 70 % reduzierten Gehalt an Taurin im Gesamtlebergewebe, wohingegen er in den Hepatozyten nur um 30 % verringert ist. Trotz niedrigerem Tauringehalts unterscheiden sich die Mäuse nicht hinsichtlich des Anteils an Taurin-konjugierten Gallensäuren in der Galle (Warskulat et al. 2006). Dies spricht gegen einen starken Einfluss der Taurintransporterexpression auf die Taurinkonjugation.

Csad wurde unerwartet zumindest auf mRNA-Ebene durch die Cholsäurefütterung in beiden Genotypen herunterreguliert (siehe Abb. 4.37. F2). Da hiervon aber beide Genotypen gleichermaßen betroffen sind, sollte dies nicht ursächlich für die Konjugationsunterschiede sein. Die Expression des Taurintransportergens *Slc6a6* stieg stattdessen durch die Cholsäurefütterung vor allem bei den *Slc10a5*-Knockout-Mäusen an, allerdings mit großer Streuung der Werte (siehe Abb. 4.37 F1). Sollte sich dies auf Proteinebene gleichermaßen auswirken, müsste der Taurintransport in die Zellen erhöht gewesen sein und hätte zu einer Verbesserung der Taurinkopplung geführt. Da die Konjugationsrate in dieser Gruppe jedoch am geringsten war, ist es wahrscheinlich, dass *Slc6a6* kompensatorisch hochreguliert wurde, um die defiziente Konjugation zu verbessern.

Eine gesteigerte Expression des *Slc6a6*-Gens nach 0,25 % Cholsäurefütterung wurde bereits von Miyata et al. (2005) in den von ihnen untersuchten *Fxr*-Knockout-Mäusen sowie den Wildtypkontrolltieren beschrieben. Diese korrelierte bei beiden Gruppen mit einer verminderten Taurinkonzentration um etwa die Hälfte in den Leberzellen. Leider wurde von diesen Wildtypmäusen nicht der Anteil unkonjugierter Gallensäuren in der Galle bestimmt, sondern nur nach 1 % Cholsäure im Futter. Dabei vervierfachte sich die Menge der in die Galle ausgeschiedenen Gallensäuren, und der Anteil unkonjugierter Gallensäuren stieg auf 31 %. Gleichzeitig sank der Tauringehalt in der Leber auf ein Zehntel, und die *Slc6a6*-Expression stieg

nochmal leicht an verglichen mit 0,25 % Cholsäurefütterung (Miyata et al. 2005). Somit scheint die *Slc6a6*-Expression tatsächlich, wie zu erwarten wäre, durch eine erhöhte Konzentration an unkonjugierten Gallensäuren oder einen verminderten Taurinspiegel induziert zu werden.

Ob die erhöhte *Slc6a6*-Expression bei den mit Cholsäure gefütterten *Slc10a5*-Knockout-Mäusen jedoch ein Hinweis auf eine verminderte Taurinkonzentration in den Leberzellen ist, oder durch die anders begründete Zunahme unkonjugierter Gallensäuren ausgelöst wird, ist ungewiss. Da leider aus dem bereits für die histologischen Untersuchungen und die RNA-Extraktion fixierten Lebergewebe nachträglich nicht mehr die Taurinkonzentration bestimmt werden kann, ist dieser Punkt nicht abschließend zu klären. Ein genereller Taurinmangel erscheint jedoch sehr unwahrscheinlich, da bei Standardhaltungsbedingungen keine Unterschiede in der Taurinkonjugation von Gallensäuren und der Expression von *Slc6a6* auffielen.

5.9.3 Expression der CoA-Ligasen und Gallensäureaminotransferase

Eine verminderte Gallensäurekonjugation wurde bereits bei zwei verschiedenen Mausmodellen, der *Hnf4a*- und der *Slc27a5*-Knockout-Maus, festgestellt. In beiden Fällen wurde das Konjugationsdefizit durch die verminderte bzw. fehlende Expression von *Slc27a5* (FATP5) ausgelöst (Inoue et al. 2004; Hubbard et al. 2006).

Die *Slc27a5*-Knockout-Maus zeigte eine normale Menge des Gesamtgallensäurepools in Leber, Galle, Serum und Urin. Allerdings waren 83 % der gemessenen Gallensäuren bei der *Slc27a5*-Knockout-Maus unkonjugiert, während die Wildtypkontrolle nur 5% unkonjugierte Gallensäuren aufwies. Trotzdem zeigten diese Knockout-Mäuse äußerlich keine Abweichung zu den Wildtypwurfgeschwistern (Hubbard et al. 2006). Damit ähnelte ihr Phänotyp in stärkerer Ausprägung dem der *Slc10a5*-Knockout-Maus nach 0,5 % Cholsäurefütterung.

Aus der Zusammensetzung der Gallensäuren konnte bei der *Slc27a5*-Knockout-Maus geschlossen werden, dass *de novo* synthetisierte Gallensäuren wie Chenodeoxycholat Taurinkonjugiert werden können, wohingegen sekundäre Gallensäuren gar nicht mehr konjugiert werden. Auch Studien *in vitro* an Lebermikrosomen bestätigten, dass die CoA-Kopplung von ^{14}C -Cholsäure stark im Knockouttyp vermindert war. Somit scheint FATP5 an der Rekonjugation von Gallensäuren, nicht aber der Konjugation der *de novo* synthetisierten Gallensäuren beteiligt zu sein (Hubbard et al. 2006). Die Ergebnisse dieser Studien konnten mit einer *Slc27a5*-Knockdown-Maus bestätigt werden. *In vitro* wurde der Gallensäuremetabolismus mit $^2\text{H}_4$ -markierter Cholsäure an Hepatozyten verglichen. Die Knockdownhepatozyten zeigten 4,6-fach geringere Glycin- und 3,8-fach geringere Taurinkonjugation als die Wildtypkontrol-

le. Auch *in vivo* bei intravenöser Applikation von Cholsäure zeigten die Knockdown-Mäuse eine geringere Menge Taurocholsäure im Plasma (AUC 75 % geringer) als die Kontrolltiere und ein verändertes Spektrum an unkonjugierten Gallensäuren in der Galle (Castro-Perez et al. 2011). Diese Ergebnisse wurden durch *In-vitro*-Versuche von Steinberg et al. (2000) bestätigt, die für FATP5 die CoA-Kopplung von Cholsäure, Chenodeoxycholsäure, Deoxycholsäure und Lithocholsäure nachwiesen.

Dementsprechend könnte eine niedrigere Proteinexpression von FATP5 das Konjugationsdefizit in der *Slc10a5*-Knockout-Maus erklären. Da die tatsächlich vorhandene Proteinmenge nicht untersucht wurde, kann nur die Genexpression von *Slc27a5* in der Leber herangezogen werden. Es zeigte sich tatsächlich eine statistisch signifikante Herabregulation durch die Cholsäurefütterung, jedoch gleichwertig bei beiden Genotypen (siehe Abb. 4.37 C2). Da die Wildtyp-Maus kein Konjugationsdefizit aufwies, hätte man eher eine Heraufregulierung als Adaptation erwartet. Die Verminderung der *Slc27a5*-Expression ist somit höchstwahrscheinlich nicht die Ursache für die erhöhte Konzentration an unkonjugierten Gallensäuren bei der *Slc10a5*-Knockout-Maus.

Ein weiteres Protein, welches Gallensäuren mit CoenzymA koppeln kann, ist FATP2 (*Slc27a2*). Es wurde im Zellexperiment allerdings keine CoA-Kopplungsaktivität für Cholsäure gemessen, lediglich für den C27-Cholsäure-Vorläufer THCA (*Trihydroxy-cholestanoic acid* = 3 α ,7 α ,12 α -Trihydroxy-5 β -Cholestansäure) und die langkettige Fettsäure Palmitat (C_{16:0}) (Mihalik et al. 2002). Dies passt zu der allgemeinen Auffassung, dass FATP2 die peroxisomale Kopplung der neusynthetisierten Gallensäuren mit CoenzymA katalysiert.

Es wurde auch eine Untersuchung zur *Slc25a2*-Knockout-Maus publiziert, die jedoch keinen Phänotyp bezüglich Zucht und Verhalten und keine histologischen Abweichungen in Leber, Niere und Gehirn aufweist. Festgestellt wurde nur eine Verminderung der Fähigkeit, sehr langkettige Fettsäuren mit CoenzymA zu koppeln (Heinzer et al. 2003). Leider wurden in dieser Untersuchung keine Gallensäure- oder Cholesterinwerte mitbestimmt. Das hätte dazu beitragen können aufzuklären, ob FATP2 wirklich nur in die Gallensäureneusynthese oder auch die Rekonjugierung involviert ist.

Die im eigenen Cholsäurefütterungsexperiment quantitativ am meisten mit CoenzymA zu aktivierenden Gallensäuren waren die von außen zugeführte Cholsäure und die sich davon ableitenden sekundären Gallensäuren. Die Gene für die Enzyme der Gallensäureneusynthese – auch das Schlüsselenzym CYP7A1 – waren massiv herunterreguliert, und es waren fast keine Chenodeoxycholsäure oder Muricholsäuren mehr im Gallensäurepool vorhanden. Dementsprechend muss die Rate der neusynthetisierten Gallensäuren minimal sein gewesen sein. Die

bei *Slc10a5*-Knockout- und Wildtyp-Maus gleichstarke signifikante Verminderung der *Slc27a2*-Expression durch die Cholsäurefütterung (siehe Abb. 4.37 C1) stünde somit im Einklang mit der unter Cholsäurefütterung nicht benötigten Enzymaktivität von FATP2, wenn dieses nur C27-Gallensäuren mit CoenzymA koppelt.

Für eine verminderte Konjugation kann nicht zuletzt auch die BAAT verantwortlich sein, die als letzter Schritt die Konjugation der Gallensäure mit Taurin oder Glycin katalysiert. Bei der Maus wurde für die BAAT *in vitro* eine Aktivität zur Konjugation von Gallensäuren mit Taurin, nicht Glycin nachgewiesen (Falany et al. 1997). Leider stehen keine Daten aus einem Knockout-Mausmodell zur Verfügung. Im Menschen führen *Nonsense*-Mutationen im *BAAT*-Gen zu einem völligen Fehlen von Taurin- und Glycin-konjugierten Gallensäuren. Klinisch fielen diese Patienten im frühen Kindesalter durch Mangel an fettlöslichen Vitaminen und zum Teil Wachstumsstörungen und Leberveränderungen auf. Zu über 80 % wird unkonjugiertes Cholat in die Galle abgegeben, zusätzlich ist die Gesamtgallensäuremenge im Duodenum zu gering, um effizient Fette zu absorbieren (Setchell et al. 2013).

Dementsprechend könnte tatsächlich eine Verminderung der BAAT auch in der Maus zur Zunahme von unkonjugierten Gallensäuren führen. Jedoch korrelierte zwar die Zunahme an unkonjugierten Gallensäuren bei den mit Cholsäure gefütterten *Slc10a5*-Knockout-Mäusen mit einer verminderten *Baat*-Expression, bei den Wildtypmäusen erniedrigte sich die Expression jedoch auch, ohne dass diese ein Konjugationsdefizit ausprägen. Genau wie *Slc27a2* und *Slc27a5* zeigten sich also auch in der *Baat*-Genexpression keine genotypspezifischen Unterschiede, jedoch eine signifikante Verminderung durch die Cholsäurefütterung (Abb. 4.38. D1). Somit erscheint die erniedrigte *Baat*-Expression als Begründung für das Konjugationsdefizit der *Slc10a5*-Knockout-Maus äußerst unwahrscheinlich. Auf die Regulation der Genexpression dieser drei Enzyme wird in Kapitel 5.12.2 näher eingegangen.

5.9.4 Hemmung der Konjugationsenzyme oder Abspaltung des CoenzymA von aktivierten Gallensäuren

Wenn die Aktivität der an der Gallensäurekonjugation beteiligten Enzyme durch aktivierende oder hemmende Faktoren beeinflusst wird, würde sich die Konjugationsrate ändern. Leider kann zum Aktivitätsgrad dieser Enzyme keine Aussage getroffen werden, da dafür die Aktivität der Enzyme aus dem Mäusegewebe *in vitro* hätte bestimmt werden müssen. Diese mögliche Begründung für eine unterschiedliche Konjugationsrate zwischen *Slc10a5*-Knockout- und Wildtyp-Maus kann somit nicht überprüft werden.

Ein weiterer Faktor für die Synthese konjugierter Gallensäuren ist, dass die BAAT genügend CoenzymA-aktivierte Gallensäuren als Edukt zur Verfügung hat. Aus der Fettsäurehomöosta-

se ist bekannt, dass ein Gleichgewicht zwischen freiem und gekoppelten CoenzymA aufrechterhalten wird (Hunt et al. 2002a; Leonardi et al. 2005). Hierfür spielen neben den CoenzymA koppelnden Enzymen – zum Beispiel FATPs – diejenigen eine Rolle, die CoenzymA wieder abspalten können. Das geschieht entweder bei der Amidation von Fettsäuren oder Gallensäuren über die BAAT oder ACNATs (Acyl-CoenzymA-Aminosäure-N-Acyltransferasen, siehe 5.10) oder durch die Gruppe der Acyl-CoA-Thioesterasen (ACOTs).

Acyl-CoA-Thioesterasen konnten in Peroxisomen, Mitochondrien und dem Cytosol nachgewiesen werden und spalten die Thioesterverbindungen von kurz- bis langkettigen Fettsäure-CoA-Verbindungen. Dies erlaubt der freien Fettsäure das Passieren über die Membran von beispielsweise Peroxisomen (Hunt et al. 2012). Für eines dieser Proteine – ACOT8 – konnte bisher zusätzlich zu einem breiten Spektrum an Fettsäuren auch eine Aktivität auf Gallensäure-CoA-Thioester nachgewiesen werden (Hunt et al. 2002b). Bei ACOT8 handelt es sich um ein peroxisomales Enzym, dessen Thioesterase-Aktivität für Choloyl-CoA und Chenocholoyl-CoA nachgewiesen wurde und das durch CoA-SH gehemmt wird. Es steht somit in Konkurrenz mit der BAAT um die Gallensäure-CoenzymA-Verbindungen (Hunt et al. 2002b). Das bedeutet, dass eine Hochregulation von ACOT8 zu einer vermehrten Spaltung der entstandenen Gallensäure-CoA-Thioester führen würde, bevor diese durch die BAAT konjugiert werden können. Dadurch würde die Konjugationsrate sinken.

Das Füttern mit 0,5 % Cholsäure hatte hingegen einen schwachen, aber signifikant erniedrigenden Effekt auf die *Acot8*-mRNA-Expression sowohl von *Slc10a5*-Knockout- als auch Wildtyp-Mäusen (siehe Abb. 4.37 E2). Somit ist dieser Grund für die verminderte Konjugation auszuschließen.

Hingegen wurde eine andere Acyl-CoA-Thioesterase stark hochreguliert. Die sehr schwache Expression von *Acot3* stieg durch die Cholsäurefütterung besonders in den Knockout-Mäusen an (siehe Abb. 4.37 E1). Dieses Enzym spaltet langkettige Acyl-CoAs (Westin et al. 2004). Seine Expression soll bei PPAR-Aktivierung steigen, um bei hohem Fettangebot das Passieren von freien Fettsäuren durch die peroxisomale Membran zu beschleunigen (Kirkby et al. 2010). Die Hochregulation dieses Enzyms bei den Knockout-Mäusen, die zu diesem Zeitpunkt ein Gallensäurekonjugationsdefizit aufweisen, könnte in dem Bestreben liegen, mehr CoenzymA für die Gallensäurekopplung bereitzustellen. Wie genau diese Regulation abläuft, ist allerdings unklar. Denn dafür hätten die Konzentrationen von Fetten und Fettsäuren in der Leber dieser Mäuse bestimmt werden müssen, was im Rahmen des Cholsäurefütterungsexperiments nicht geplant war.

5.9.5 Transport von Edukten und Produkten der Gallensäurekonjugationsreaktionen

Der mögliche Ablauf der Rekonjugation und die subzelluläre Lokalisation der beteiligten Enzyme wurden bereits in der Einleitung zu Kapitel 5.9 diskutiert. Kurz gesagt, muss zunächst eine Aktivierung der Gallensäuren mit CoenzymA durch FATP5 im Endoplasmatischen Retikulum oder FATP2 im Peroxisom erfolgen und danach die Konjugation mit Taurin über die BAAT im Zytoplasma oder Peroxisom durchgeführt werden.

Da vermehrt unkonjugierte Gallensäuren bei den mit Cholsäure gefütterten *Slc10a5*-Knockout-Mäusen in der Galle gemessen wurden, ist mit Sicherheit auszuschließen, dass die Aufnahme über die Plasmamembran oder der Export in die Galle für unkonjugierte Gallensäuren vermindert ist. Zusätzlich lagen die Expressionswerte der für Aufnahmetransporter codierenden Gene für *Slc10a1* auf dem gleichen Niveau oder für *Slc10b2* und *Slc10a4* sogar über dem der Wildtypmäuse (siehe Abb. 4.37 A), und auch für die Exporttransportergene *Abcg11* und *Abcb2* unterschied sich die Expression nicht zwischen den Genotypen (siehe Abb. 4.37 B1 und B2). Die *Abcb1a*-Genexpression war vor allem in den Knockoutmäusen stark erhöht (Abb. 4.37 B3), was den Versuch widerspiegeln könnte, über MDR1 die unkonjugierten Gallensäuren aus der Zelle zu transportieren. Allerdings wurde bislang keine Transportaktivität von MDR1 für Gallensäuren gezeigt.

Davon ausgehend, dass also weder die Aufnahme noch der Export über die Plasmamembran für unkonjugierte wie konjugierte Gallensäuren den limitierenden Faktor darstellt, könnte der Transport zwischen den subzellulären Kompartimenten eine Rolle spielen. Eine diskutierte Lokalisation der CoA-Kopplung durch FATP5 ist im Endoplasmatischen Retikulum (Solaas et al. 2000). Unkonjugierte Gallensäuren wie Cholsäure könnten passiv in das Organell gelangen, da Cholsäure mit einem logP-Wert von 2,02 lipophil ist und mit einem pK_s-Wert von 5 bei physiologischem pH-Wert von 7,2 (Abb. 5.4 A) einen ausreichend hohen Anteil an ungeladenen membranpermeablen Molekülen aufweist (Abb. 5.3). Nach der Aktivierung mit CoenzymA würde der Gallensäure-CoA-Ester dann aber einen Transporter benötigen, der ihn aus dem Endoplasmatischen Retikulum ins Zytoplasma transportiert, wo die Gallensäure dann Taurin-konjugiert werden kann. Denn neben der Größenzunahme durch das CoA weist beispielsweise Choloyl-CoA einen LogP-Wert von -4,3 auf und ist somit hydrophil, und weiterhin läge nur jedes millionste Molekül ungeladen vor, wodurch ein passiver Membrandurchtritt ausgeschlossen werden sollte (Abb. 5.3). Über einen solchen Transporter wurde bislang nicht berichtet. Diese Funktion könnte SLC10A5 übernehmen, welcher laut Studien an transfizierten Zellen im Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat lokalisiert ist (siehe 4.1.5).

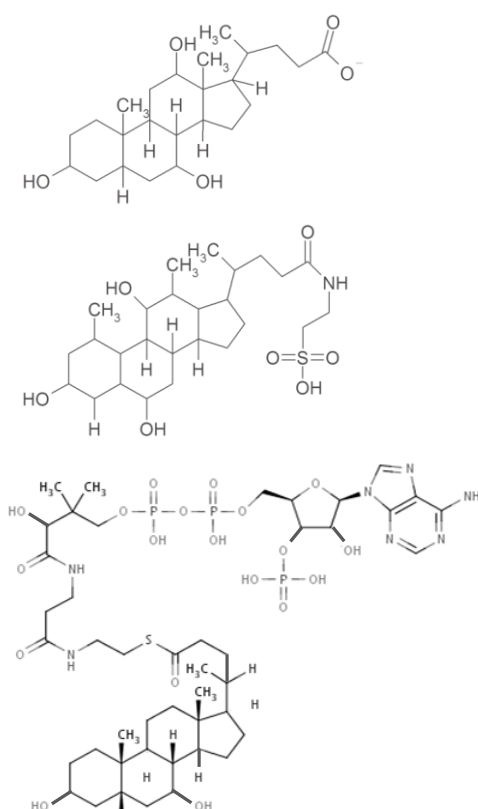
Membranpermeabilität	Membranpermeabilität				
	<u>Cholsäure</u>		hoch	gering	
	$pK_S = \sim 5$		HA	A^-	
	HI = 0,13	pH 7	1	: 100	
	LogP = 2,02	pH 5	1	: 1	
	<u>Taurocholsäure</u>				
	$pK_S = \sim 2$		HA	A^-	
	HI = 0	pH 7	1	: 100.000	
	LogP = -0,53	pH 5	1	: 1.000	
	<u>Choloyl-CoA</u>				
	$pK_S = 0,83$		HA	A^-	
	HI = n. d.	pH 7	1	: 1.000.000	
	LogP = -4,3	pH 5	1	: 10.000	

Abb. 5.3 Chemische Eigenschaften von Cholsäure, Taurocholsäure und Choloyl-CoA und ihr Einfluss auf die Membranpermeabilität

Die Membranpermeabilität nimmt von Cholsäure über Taurocholsäure zu Choloyl-CoA stark ab, da sich die Lipophilie und der Anteil ungeladener Moleküle vermindern. Die pK_S -Werte von Cholsäure (~ 5) und Taurocholsäure (~ 2) sind aus experimentellen Daten bekannt (O'Maille et al. 1977) und für Choloyl-CoA aus bioinformatischen Vorhersagen (Wishart et al. 2013; www.hmdb.ca). Der LogP-Wert (P = n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient) ist ein experimentell bestimmtes Maß für die Lipophilie, bei dem Substanzen mit positivem LogP-Wert als lipophil und mit negativem logP-Wert als hydrophil eingestuft werden. Der LogP-Wert wurde für Cholsäure (2,02, lipophil) experimentell ermittelt (Roda et al. 1990), für Taurocholsäure ($-0,53$, schwach hydrophil) und Choloyl-CoA ($4,3$, hydrophil) existieren nur bioinformatische Vorhersagen (Wishart et al. 2013; www.hmdb.ca). Als weiteres Maß für die Lipophilie einer Gallensäure kann der Hydrophobizitätsindex herangezogen werden, der Cholsäure mit einem Wert von 0,13 als hydrophob einstuft und Taurocholsäure mit 0 als neutral (siehe Tab. 1.1). Das Gleichgewicht zwischen protonierter (ungeladener) Form (HA) und unprotonierter (geladener) Form (A^-) der Substanzen wurde mittels der Henderson-Hasselbalch-Gleichung [$pH = pK_S + \log(c(A^-)/c(HA))$] berechnet.

Betrachtet man die Transportrichtung von NTCP und ASBT, welche als Membranaufnahmetransporter ihre Substrate von extrazellulär nach intrazellulär transportieren, und bedenkt die Membranorientierung von SLC10A5, kommt für SLC10A5 tatsächlich eine mögliche Transportrichtung aus dem Organellenlumen in das Zytoplasma in Frage (Abb. 5.4. B).

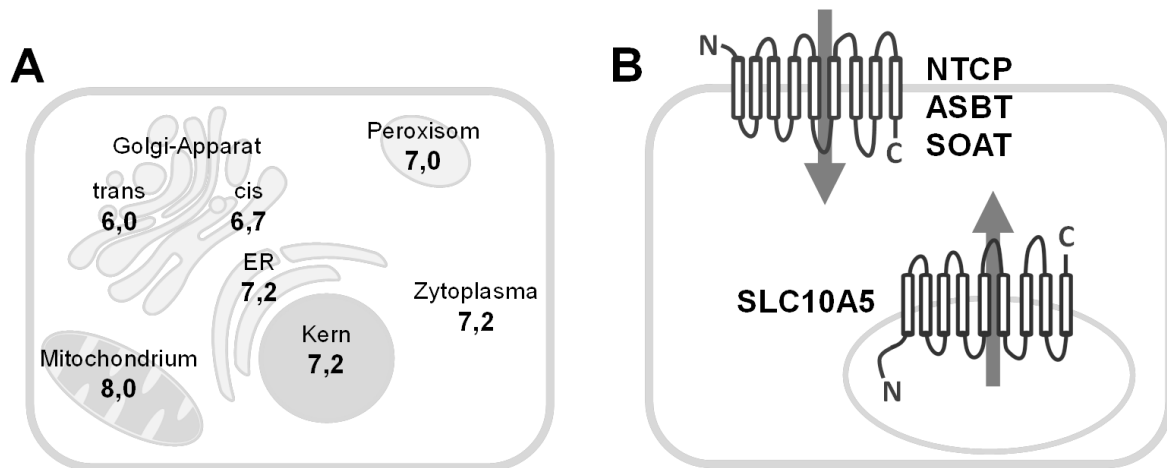


Abb. 5.4 Darstellung der pH-Werte der Zellkompartimente (A) und schematische Darstellung der Membrantopologie des SLC10A5-Proteins (B)

(A) Entgegen dem extrazellulären und dem Blut-pH-Wert von 7,4 hält die Zelle in ihrem Inneren einen pH-Wert von 7,2 im Zytoplasma und im Zellkern aufrecht. Der pH-Wert der Peroxisomen ist neutral, während die Matrix der Mitochondrien mit pH 8 leicht basisch ist. Beim Golgi-Apparat sinkt der pH-Wert von der cis-Seite mit pH 6,7 zur Trans-Seite mit pH 6,0. (Abbildung basierend auf (Casey et al. 2010)).

(B) Bei den SLC10-Familienmitgliedern NTCP, ASBT und SOAT handelt es sich um Membranaufnahmetransporter, deren bioinformatisch vorhergesagte Transmembranstruktur mehrheitlich ebenso wie für SLC10A5 einen intrazytoplasmatischen C-Terminus und einen extrazellulären N-Terminus angibt. In einem Zellorganell läge analog dazu beim SLC10A5-Protein der C-Terminus im Zytoplasma und der N-Terminus im Inneren des Organells. Die Orientierung des C-Terminus zum Zytoplasma hin ließ sich außerdem an hSLC10A5-V5-transfizierten HepG2-Zellen zeigen (siehe Abb. 4.6). SLC10A5 würde demnach eine Transportrichtung vom Lumen des Organells in das Zytoplasma aufweisen.

Die andere favorisierte Lokalisation der Gallensäurekonjugation ist das Peroxisom (Pellicoro et al. 2007; Rembacz et al. 2010). Die Aktivierung mit Coenzym A würde dann an der zytoplasmatischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums durch FATP5 erfolgen und ein Import der CoA-gekoppelten Gallensäure in das Peroxisom folgen. Nach der Konjugation müsste die Taurin-gekoppelte Gallensäure wieder aus dem Peroxisom exportiert werden, da ein passiver Durchtritt durch die Membran der bei neutralem pH-Wert geladenen konjugierten Gallensäure nicht möglich ist (Abb. 5.3 und 5.4 A). Es könnte bereits ein nicht ATP-abhängiger Transport von konjugierten Gallensäuren über die peroxisomale Membran gezeigt werden, jedoch wurde der Transporter nicht bestimmt (Visser et al. 2007). Dieser unbekannte Transporter wird neben dem Export über die Plasmamembran durch BSEP als geschwindigkeitsbestimmend für die Abgabe konjugierter Gallensäuren in die Galle angesehen (Hunt et al. 2012). Dementsprechend könnte ein Fehlen dieses Transporters die Konjugationsrate senken, da das Produkt der Konjugation nicht abtransportiert würde. Es wäre denkbar, dass beide beschriebenen Möglichkeiten der Rekonjugation parallel in den Zellen ablaufen, sodass ein Ausfall eines Transporters nicht zu einem vollständigen Verlust der Konjugationsfähigkeit führt.

Demnach könnte der Phänotyp der mit Cholsäure gefütterten *Slc10a5*-Knockout-Maus zu erklären sein, falls es sich bei diesem unidentifizierten Transporter tatsächlich um SLC10A5 handelte.

Dagegen spricht, dass SLC10A5 bislang nicht im Peroxisom nachgewiesen wurde. Es wurde jedoch noch nicht abschließend geklärt, ob SLC10A5 nicht doch in Peroxisomen vorkommt. Zumindest anhand der bioinformatischen Vorhersage gab es Hinweise darauf, dass es in der peroxisomalen Membran lokalisiert sein könnte (siehe 4.1.4). Für einige der in diesen Metabolismus involvierten Enzyme ist es unbestimmt, wo sie auf subzellulärer Ebene lokalisiert sind, oder es wird eine duale Sortierung je nach Umständen vermutet. Dies betrifft beispielsweise die BAAT, die zytosolisch und peroxisomal nachgewiesen wurde und nach Stimulation mit PPAR-Agonisten vermehrt cytosolisch gefunden wird (Solaas et al. 2004; Hunt et al. 2012). In HeLa-Zellen transfiziertes Maus-BAAT-GFP zeigte sich in einer Untersuchung sogar ausschließlich im Cytosol (Buch et al. 2009). Für ACOT1 und ACOT2 wird auch eine cytosolisch/mitochondriale sowie peroxisomale Lokalisation vermutet (Hunt et al. 2012). In COS-1-Zellen wird FATP2 ins Endoplasmatische Retikulum sortiert, obwohl das endogene FATP2 in Peroxisomen lokalisiert ist (Mihalik et al. 2002). Solange also nicht das natürlich exprimierte SLC10A5-Protein sicher lokalisiert wurde, kann keine sichere Aussage getroffen werden.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass es sich bei SLC10A5 gar nicht um einen Transporter handelt, sondern um einen Cofaktor, etwa für FATP5. Es ist bekannt, dass in der Plasmamembran durch CD36 Fettsäuren gebunden werden, die dann an die FATPs „weitergereicht“ werden (Doege et al. 2006b). In diesem Fall würde das Fehlen von SLC10A5 die Effektivität der CoenzymA-Kopplung vermindern, und somit könnten auch weniger aktivierte Gallensäuren konjugiert werden.

Eine Übersicht über die möglichen Konjugationswege und die potenzielle Beteiligung von SLC10A5 wird in Abb. 5.5 gegeben.

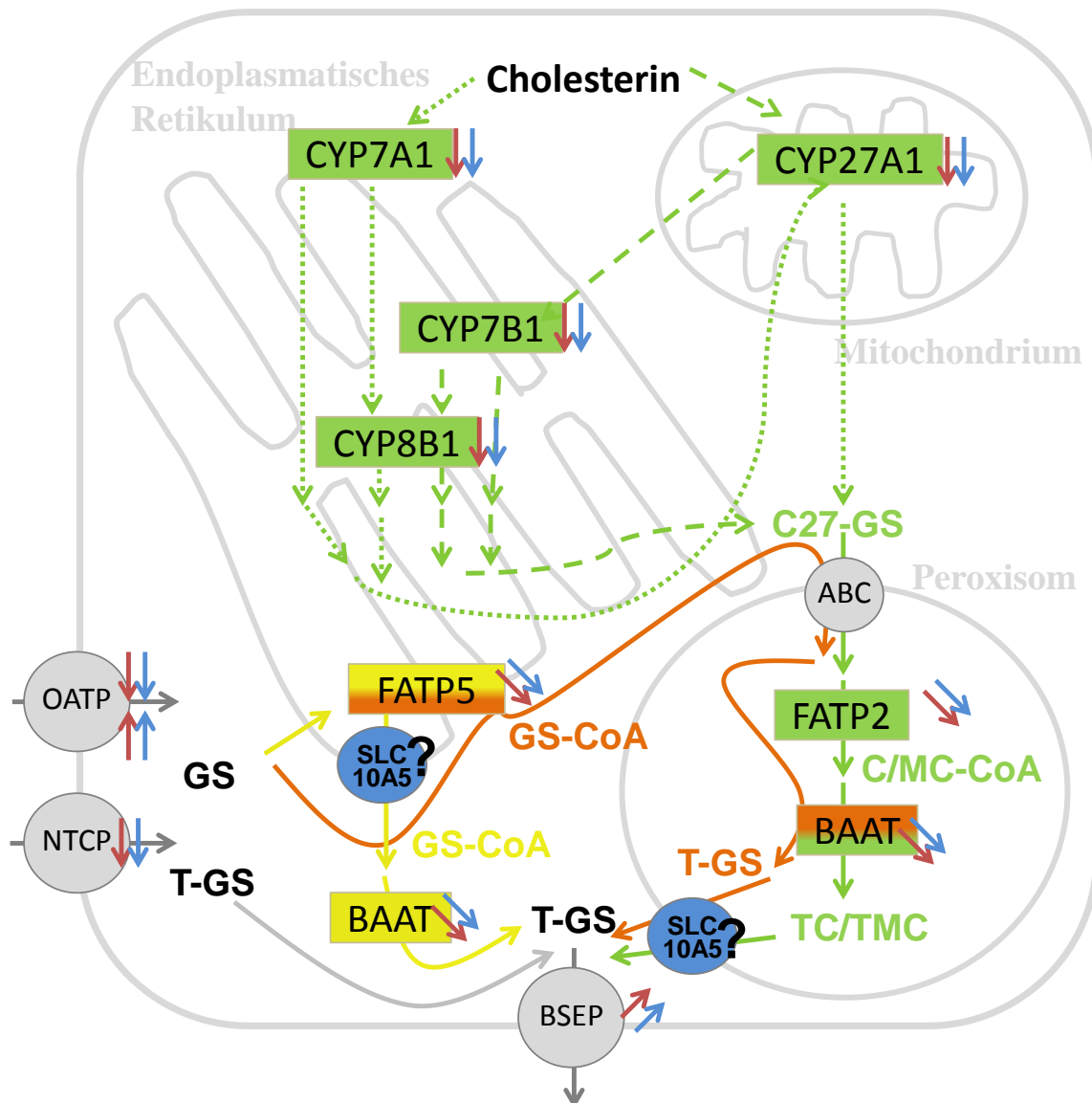


Abb. 5.5 Schematischer Ablauf der Gallensäureneusynthese, der Konjugation rezirkulierender Gallensäuren und des Gallensäuretransports

Dargestellt sind die Gallensäureaufnahme- und -Exporttransporter sowie die an der Gallensäureneusynthese beteiligten Enzyme (Grün). Zwei mögliche Hypothesen für die Rekonjugation von recycelten Gallensäuren werden in Gelb und Orange dargestellt. Die Regulation der Genexpression der beteiligten Proteine nach 0,5 % Cholsäurefütterung ist mit roten (*Slc10a5*-Knockout-Maus) und blauen (Wildtyp-Maus) Pfeilen gekennzeichnet.

Bei Fütterung von 0,5 % Cholsäure ist die Gallensäureneusynthese stark vermindert, die Konzentration der aus dem Darm absorbierten und zur Leber gelangenden Gallensäuren jedoch erhöht. Die konjugierten Gallensäuren werden über NTCP in die Leberzelle aufgenommen und können ohne weitere Modifikation über BSEP in die Galle ausgeschieden werden. Unkonjugierte Gallensäuren müssen zuvor mit Taurin konjugiert werden. Der einen Hypothese zufolge werden die unkonjugierten Gallensäuren im Endoplasmatischen Retikulum von FATP5 mit Coenzym A aktiviert und müssten danach über einen unidentifizierten Transporter in das Zytoplasma transportiert werden, um dort von der zytoplasmatischen BAAT Taurin-konjugiert zu werden. Die andere schlägt vor, dass die unkonjugierten Gallensäuren von FATP5 mit Coenzym A aktiviert werden und über einen noch unidentifizierten ABC-Transporter in das Peroxisom transportiert werden, wo sie von der peroxisomalen BAAT Taurin-konjugiert werden. Über einen bislang unbekannten Transportmechanismus verlassen die konjugierten Gallensäuren das Peroxisom wieder.

Bei den unidentifizierten Exporttransportern im Endoplasmatischen Retikulum oder dem Peroxisom könnte es sich um SLC10A5 handeln.

5.10 Zunahme der Glycinkonjugation bei der *Slc10a5*-Knockout-Maus

Die Gallensäure-Aminotransferase (BAAT) der Maus zeigte *in vitro* eine Konjugationsaktivität für Taurin, jedoch nicht für Glycin (Falany et al. 1997). Dies stimmt überein mit dem Gallensäureprofil der Maus *in vivo*, bei dem fast nur Taurinkonjugate vorherrschen. Inoue et al. konnten mit einer leberspezifischen *Hnf4a*-Knockout-Maus zeigen, dass, obwohl die BAAT stark herunterreguliert wurde und unkonjugierte Gallensäuren zunahmen, die Gesamtmenge der Taurinkonjugation unverändert blieb und die Glycinkonjugation sogar zunahm. Sie schlossen daraus, dass ein weiteres Enzym eine Rolle spielen könnte, welches Gallensäuren mit Taurin und Glycin konjugieren kann. Ein Gen mit ähnlicher Sequenz wie *Baat* wurde von ihnen als hochreguliert in den Knockout-Mäusen gefunden, welches sich als *Acnat2* herausstellte (Inoue et al. 2004). Die Genexpression dieses Enzyms, der Acyl-Coenzym-Aminosäure-N-Acyltransferase-2, wird durch die Cholsäurefütterung auch im eigenen Versuch drei- bis vierfach hochreguliert (siehe Abb. 4.37 D2). Leider wurden bis jetzt keine Studien zum Substratspektrum der ACNAT2 publiziert. Das Enzym mit der höchsten Sequenzhomologie, ACNAT1, zeigt Konjugationsaktivität für lang- und sehr langkettige Fettsäuren mit Taurin und nur eine schwache Reaktion mit Gallensäure-CoAs. Diese beiden Acyl-CoA-Aminotransferasen wurden nur bei der Maus gefunden, während der Mensch nur die BAAT exprimiert (Hunt et al. 2012). Ein Aufklären der Konjugationsaktivität von ACNAT2 wäre also interessant, um die Hypothese zu überprüfen, dass diese bei mangelnder BAAT-Aktivität Gallensäuren mit Taurin oder Glycin konjugieren kann. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die *Slc10a5*-Knockout-Mäuse die fehlende Taurinkonjugation mit vermehrter Glycinkonjugation teilweise zu kompensieren scheinen, da sie 2,6-mal so viele Glycinkonjugierte Gallensäuren aufweisen wie die Wildtyp-Mäuse. Allerdings spielen diese mit Glycin konjugierten Gallensäuren mit ihrem 2%igen Anteil am Gesamtgallensäurepool quantitativ keine große Rolle.

5.11 Transport von Cholesterin und Phospholipiden

In der Galle muss das Verhältnis von Gallensäuren, Phospholipiden und Cholesterin in einem bestimmten Verhältnis gehalten werden, damit sich funktionelle gemischte Mizellen bilden können und das Cholesterin nicht ausfällt. Beim Menschen wird ein Verhältnis von 5 : 25 : 70 von Cholesterin : Phospholipiden : Gallensäuren als physiologisch angesehen. Übersteigt das Cholesterin eine kritische Konzentration, kann es ausfallen, und es können sich Cholesteringallensteine bilden (Venneman et al. 2010; Herold et al. 2010). Bei der Maus wurden bei ge-

sunden Individuen ähnliche Verhältnisse mit einem Verhältnis von 1 : 13 : 42 (bezogen auf mg/g) bei CRJ:DC1-Mäusen (Uchida et al. 1984) und von 1 : 5 : 29 (bezogen auf mM) bei B6x129/Sv-Mäusen (Mardones et al. 2001) gemessen. Andere Ergebnisse, etwa von Oude Elferink et al., zeigen zeitabhängig über zwei Stunden an gallenblasenkannulierten 129/Ola-Mäusen das Zusammenspiel von Gallefluss, Gallensäure-, Phospholipid- und Cholesterinkonzentration, die proportional zueinander abnehmen (Oude Elferink et al. 1995).

Diese Verhältnisse konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (siehe. Abb. 4.36). An den *Slc10a5*-Wildtyp-Mäusen zeigte sich mit einem Verhältnis von 1 : 1,3 : 9 (bezogen auf mg/ml) ein weniger großer Überschuss von Phospholipiden gegenüber Cholesterin. Die *Slc10a5*-Knockout-Mäuse glichen mit 1 : 1,5 : 7,7 den Wildtyp-Mäusen. Durch die Fütterung mit 0,5 % Cholsäure stiegen sowohl die Konzentrationen von Phospholipiden als auch Cholesterin signifikant an. Bei den Wildtyp-Mäusen ergab sich dabei ein Verhältnis von 1 : 0,8 : 5,5 und bei den Knockout-Mäusen von 1 : 1,4 : 6,7, sodass sich das Verhältnis insgesamt nur gering veränderte. Trotz des nur geringen Überschusses an Phospholipiden und Gallensäuren gegenüber dem Cholesterin konnten in keiner der Mäuse makroskopisch sichtbare Kristalle in der Galle nachgewiesen werden.

Cholesterin wird hauptsächlich über ABCG5/8, einen heterodimeren ABC-Transporter in die Galle transportiert (Graf et al. 2003). Die Expression von ABCG5/8 in der Leber und dem Dünndarm und folgend die Exkretion von Cholesterin wird über LXR α induziert, wie Studien mit LXR-Agonisten und *Lxr*-Knockout-Mäusen zeigen konnten. Dabei bewirken Sterole und auch Cholesterin selber eine Erhöhung ihrer Ausscheidung. Auch durch die Gabe von Chenodeoxycholat oder Cholat erhöhte sich die ABCG5/8-Expression (Repa et al. 2002). Durch die Fütterung von 0,2 % Cholat über 10 Tage konnte die Cholesterinausscheidung in der Galle auf das Dreifache erhöht werden. Der zugrunde liegende Mechanismus stellte sich als eine Hochregulation des ABCG5/8-Transportdimers in der Leber mit Aktivierung über FXR heraus, wie mit entsprechenden Knockout-Mäusen gezeigt wurde (Yu et al. 2005).

Die Aufnahme von Cholesterin aus dem Darm und die Abgabe in die Galle werden maßgeblich durch das Gallensäurespektrum bestimmt. Hierbei spielen das Verhältnis von hydrophilen zu hydrophoben Gallensäuren sowie die Emulgierung und Aufnahme von Cholesterin im Dünndarm eine Rolle, darüber hinaus auch die Expression von exkretorischen Transportern. In Versuchen, bei denen C57L/J-Mäusen über 7 Tage verschiedene Gallensäuren (jeweils 0,5 %) gefüttert wurden, zeigte sich, dass Cholsäure am stärksten die Aufnahme von Cholesterin im Darm und auch die Ausscheidung in die Galle erhöhte. Der Gallefluss nahm hierbei nur leicht, aber nicht signifikant zu (Wang et al. 2003a). Auch die eigenen Ergebnisse an den

Slc10a5-Wildtyp- und -Knockout-Mäusen zeigten bei beiden Genotypen durch die 0,5 % Cholsäurefütterung eine Erhöhung – sogar eine Verdreifachung – der Cholesterinkonzentration in der Galle bei gleichzeitiger Verdreifachung des Galleflusses. Die mit Cholsäure gefütterten Knockout-Mäuse wiesen dabei eine statistisch signifikant niedrigere Ausscheidung als ihre Wildtypkontrolltiere auf (siehe Abb. 4.33 und 4.36).

Auch hier ist eine Expressionserhöhung von *Abcg5/8* als Ursache wahrscheinlich. In der Leber erhöhte sich die bei beiden Genotypen gleiche Expression von *Abcg5* signifikant durch die Cholsäurefütterung und zeigte eine Verdopplung bei den Knockout- bzw. Verdreifachung bei den Wildtypmäusen (Abb. 4.37 H1). Für *Abcg8* zeigte sich eine ähnliche Regulation. Die zwischen den Genotypen nicht verschiedene Expression bei Kontrollfütterung verdoppelte sich bei der Wildtyp- bzw. vervierfachte sich bei der Knockout-Maus durch die Cholsäurefütterung (siehe Abb. 4.37 H2). Die generelle Tendenz der Erhöhung der Cholesterinausscheidung durch vermehrte *Abcg5/8*-Expression nach Fütterung mit Cholsäure kann demnach beobachtet werden. Allerdings zeigten die mit Cholsäure gefütterten *Slc10a5*-Knockout-Mäuse trotz signifikant höherer Genexpression des Transportergens eine geringere Cholesterinausscheidung in die Galle als die Wildtyp-Mäuse. Da jedoch nur von zwei der Galleproben der mit Cholsäure gefütterten Wildtyp-Mäuse noch genügend Material für die Bestimmung der Cholesterinkonzentration vorhanden war, ist die statistische Aussagekraft aus $n = 2$ äußerst begrenzt. Betrachtet man die Einzeltiere, korreliert zudem die Genexpression nicht direkt mit der ausgeschiedenen Menge von Cholesterin in die Galle.

Der Transport von Phospholipiden in die Galle wird über den ABC-Transporter MDR2 (*Abcb4*) vermittelt. Ein Fehlen des Transportproteins führt zum vollständigen Verlust von Phospholipiden in der Galle, wie an der *Abcb4*-Knockout-Maus gezeigt werden konnte (Smit et al. 1993; Oude Elferink et al. 1995). Fickert et al. (2001) konnten in ihren Untersuchungen an Swiss Albino Mäusen nach Fütterung von 1 % Cholsäure über eine Woche keine Unterschiede in der *Abcb4*-mRNA-Expression feststellen, obwohl sich die in die Galle ausgeschiedene Phospholipidmenge verdreifachte bei einer Verdopplung des Galleflusses. An primären Rattenhepatozyten sowie bei mit Cholsäure gefütterten Ratten konnte jedoch die Expression von *Abcb4* durch die Gallensäurezugabe stimuliert werden (Gupta et al. 2000). Auch bei den Untersuchungen von Yeh et al. (2010) zeigte sich nach zweiwöchigem Füttern von C57BL/6-Mäusen mit 0,5 % Cholsäure, dass die Expression von *Abcb4* zunahm.

Bei den eigenen Untersuchungen verdreifachte sich die Ausscheidung von Phospholipiden in die Galle durch das Füttern mit Cholsäure, während der Genotyp der Mäuse keinen statistisch signifikanten Einfluss hatte, obwohl sich die Konzentration bei den Knockout-Mäusen ten-

denziell stärker erhöhte (siehe Abb. 4.36). Die Expression von *Abcb4* spiegelte dieses wider mit einem signifikanten Anstieg durch die Cholsäurefütterung, wobei die Expression bei den mit Cholsäure gefütterten Knockout-Mäusen statistisch signifikant höher war als die der Wildtypkontrolle (siehe Abb. 4.37. H3). Es handelt sich nur um einen kleinen Unterschied, welcher allerdings ein Adaptationsversuch an die vermehrte Ausscheidung von unkonjugierten Gallensäuren bei der Knockout-Maus sein könnte.

5.12 Einfluss der 0,5 % Cholsäurefütterung auf die Genexpression bei *Slc10a5*-Knockout- und Wildtyp-Mäusen

In den folgenden Kapiteln wird genauer auf die Mechanismen der Genregulation der Mäuse im Cholsäurefütterungsversuch eingegangen. Zur besseren Nachvollziehbarkeit für den Leser werden zusätzlich zu den kursiv geschriebenen Gennamen geläufige Proteinamen in Klammern angegeben, wenn diese von der Genbezeichnung abweichen. Eine Auflistung der beschriebenen Gen- und Proteinbezeichnungen wird im Anhang in Tab. 9.3 gegeben.

5.12.1 Gallensäuretransporter in Leber, Niere und Dünndarm

Leber

Bei erhöhter Gallensäurekonzentration im Körper stellt die Regulation der Gallensäuretransporter in den Leberzellen einen Schutzmechanismus gegen Hepatotoxizität dar (Zollner et al. 2006a). Durch das Füttern mit Cholsäure würde man demnach eine Reduktion der Expression der Gallensäureaufnahmetransporter erwarten. Die in der Array-Analyse bestimmte Genexpression von *Slc10a1* (NTCP), *Slc10a1* (OATP1A1) und *Slc10b2* (OATP1B2) wurde durch die Cholsäurefütterung herunterreguliert. Einzig *Slc10a4* (OATP1A4) stieg in seiner Genexpression an – mit signifikant höherer Expression in den Knockout-Mäusen (siehe Abb. 4.37). Dokumentiert wurde die Reduktion der Gen-/Proteinexpression von *Slc10a1*/NTCP, dem Hauptaufnahmetransporter für konjugierte Gallensäuren, bei durch Gallengangsligatur induzierter Cholestase (Fickert et al. 2001; Wang et al. 2003b). Auch eine Reduktion nach Fütterung mit 0,5 % Cholsäure auf mRNA- und Proteinebene wurde beobachtet (Zollner et al. 2006a; Zhang et al. 2012). Die Herabregulierung konnte ab 0,3 % Cholsäurekonzentration im Futter ausgelöst werden (Song et al. 2015). Zusätzlich zur Natrium-abhängigen Aufnahme von Gallensäuren durch NTCP wurde für verschiedene OATPs der Maus eine Transportaktivität vor allem auch für unkonjugierte Gallensäuren gezeigt. *Slc10b2*-Knockout-Mäuse weisen beispielsweise eine verminderte Aufnahme von Cholsäure, aber nicht Taurocholsäure aus dem Plasma auf (Csanaky et al. 2011). Die Verminderung der Transporterexpression zum

Schutz der Leberzellen vor toxischen unkonjugierten Gallensäuren erscheint sinnvoll. Jedoch sinkt die Gallensäuretransportrate über OATPs bei Cholestase im Gesamten trotzdem nicht. Gezeigt wurde bei obstruktiver Cholestase durch Gallengangligatur im Rattenmodell, dass nur die Proteinexpression von OATP1A1 stark herabreguliert wird, während die von OATP1A4 und OATP1B2 unverändert blieb. Die Na⁺-unabhängige Aufnahme von Cholat und Taurocholat blieb konstant, sodass OATP1A4 und OATP1B2 unter Cholestase das fehlende OATP1A1 zu kompensieren scheinen und die Gallensäureaufnahme erhalten (Geier et al. 2007).

Analog zu den Cholestasemodellen führt auch 1 % Cholsäurefütterung zur Reduktion der Gen- und Proteinexpression von *Slco1a1*/OATP1A1 und *Slco1b2*/OATP1B (Fickert et al. 2001). Nach Fütterung mit 0,5 % Cholsäure bei der Ratte konnten Rost et al. ebenfalls eine unterschiedliche Regulation der OATPs auf Proteinebene feststellen. Während OATP1A1 und 1B2 herunterreguliert wurden, stieg die Expression des OATP1A4-Proteins an. Sie erklärten dies damit, dass die basale Expression aller OATPs über HNF1 stimuliert wird, während OATP1A4 als einziges über PXR reguliert wird. Somit könnte OATP1A4 bei Cholestase für die Ausscheidung toxischer Gallensäuren zuständig sein (Rost et al. 2003). Die erhöhte Transkription von *Slco1a4* im eigenen Experiment könnte durch die steigende Expression von *Pxr* (siehe Abb. 4.37 H1) bei gleichzeitiger Aktivierung durch cholestatische Gallensäuren zu erklären sein. Die weiteren *Slco*-Gene werden herunterreguliert, indem die Expression des sie stimulierenden Faktors HNF1 α sinkt, da HNF1 α über HNF4 α stimuliert wird, welcher bei Gallensäureüberschuss durch SHP gehemmt wird (Jung et al. 2003). Diese Regulationskaskade konnte nicht nachvollzogen werden, da die Expression von *Shp*, *Hnf4 α* und *Hnf1 α* durch die 0,5 % Cholsäurefütterung in der eigenen Untersuchung nicht verändert wurde (siehe Abb. 4.37. I).

Für die Gallensäureeffluxtransporter ist durch die erhöhte Gallensäurekonzentration der Cholsäurefütterung eine Hochregulation zu erwarten. Entsprechende Ergebnisse finden sich in der Literatur, wo für *Abcb11*/BSEP, *Abcc2*/MRP2 und *Abcb1a*/MDR1a auf mRNA- und Proteinebene eine Zunahme der Expression gezeigt wurde (Fickert et al. 2001; Zollner et al. 2003). Als Grund für die Hochregulierung von *Abcb1b* diskutierte Fickert die vormals mehrfach nachgewiesene Aktivierung über NF κ B, um Hepatotoxizität durch oxidativen Stress zu minimieren (Fickert et al. 2001). Weiterhin zeigt MDR1 wie OATP1A4 eine mögliche Stimulierung über PXR (Rost et al. 2003).

Die 0,5 % Cholsäurefütterung führte sowohl bei den *Slc10a5*-Knockout- als auch den Wildtyp-Mäusen zu einer signifikanten Hochregulierung der mRNA von *Abcb11* (BSEP), *Abcc2*

(MRP2) und *Abcb1a* (MDR1a) (Abb. 4.37 B). Auch die Expression von *Abcb1b* (MDR1b) schien durch die Gallensäurefütterung zuzunehmen, ließ sich jedoch aufgrund der starken Streuung der Werte der kontrollgefütterten Wildtyp-Mäuse nicht statistisch signifikant auswerten (siehe Abb. 4.37 B4). Nach Cholsäurefütterung lag die Expression von *Abcb1a* signifikant höher als die der Wildtypkontrollgruppe, obwohl bei Standardfutter kein Unterschied zwischen den Genotypen festzustellen war (siehe Abb. 4.37 B3). Dies könnte eine Adaptation an die vermehrte Konzentration von unkonjugierten Gallensäuren darstellen, die eine höhere Toxizität als die konjugierten Äquivalente aufweisen.

Ob auch BCRP (*Abcg2*) Gallensäuren transportieren kann, ist umstritten. Für diesen Effluxtransporter konnte bislang auf mRNA- und Proteinebene eine Herunterregulation bei Cholestase durch Gallengangligatur in der Maus nachgewiesen werden (Mennone et al. 2010). Durch die 0,5 % Cholsäurefütterung war sowohl bei den *Slc10a5*-Knockout- als auch den Wildtyp-Mäusen eine signifikante Verminderung der *Abcg2*-(*Bcrp*)-Expression erkennbar (Daten nicht gezeigt).

Niere

In der Literatur ist beschrieben, dass bei Cholestase *Slc10a2* (ASBT) in der Niere herunterreguliert wird (Zollner et al. 2006a). Da ASBT in den Nierentubuli die Gallensäuren reabsorbiert, erscheint diese Regulation schlüssig, um die zur Leber alternative renale Ausscheidung der Gallensäuren zu erhöhen. Darauf deuten die eigenen Ergebnisse nicht hin, obwohl auch hier eine erhöhte Gallensäurekonzentration im Plasma durch die Cholsäurefütterung induziert wurde. Unter Kontrollfütterung ist die *Slc10a2*-Expression bei den Knockout-Mäusen signifikant höher als bei den Wildtyp-Mäusen und nimmt bei beiden durch die Cholsäurefütterung zu. Dabei gleicht sich der Unterschied an (siehe Abb. 4.38). Allerdings ist die Streuung der Werte sehr groß.

Eine Hochregulierung von ASBT in der Niere wurde nur durch eine Aktivierung des Vitamin-D-Rezeptors bei Ratten in der Literatur beschrieben (Diss. Ansar 2009). Dieser Regulationsweg schließt sich jedoch hier aus, da VDR nur durch Lithocholat aktiviert wird, welches aber in den Knockout- nicht höher als in den Wildtyp-Mäusen konzentriert war sowie im Vergleich der Einzeltiere nicht mit der *Vdr*-Expression korrelierte. Es gibt allerdings auch Hinweise darauf, dass die mRNA-Expression von *Slc10a2* nicht unbedingt mit der im Western Blot ermittelten Proteinmenge korreliert (Miyata et al. 2009).

Auch OATP1A1 ist apikal in den proximalen Nierentubulizellen lokalisiert und kann Gallensäuren reabsorbieren. Es zeigt dabei eine geschlechtsspezifische Expression mit predominan-

tem Vorkommen in den Männchen und ist Androgen-abhängig (Cheng et al. 2006; Klaassen et al. 2010). Unter cholestatischen Bedingungen wird es herabreguliert (Slitt et al. 2007). Bei den *Slc10a5*-Knockout-Mäusen war die Expression von *Slco1a1* gegenüber den Wildtypen signifikant erhöht, verminderte sich aber durch die Cholsäurefütterung auf das Level der Wildtypen, die unter Kontroll- und Cholsäurefutter die gleiche Expression aufwiesen.

Die höhere Genexpression der Gallensäuren reabsorbierenden Transporter bei den Knockout-Mäusen könnte auf den Versuch hindeuten, vermehrt in den Urin ausgeschiedene Gallensäuren wieder rückzuresorbieren. Die Gallensäurekonzentrationen im Urin wurden nicht bestimmt. Jedoch spricht dafür, dass die Maus mit der mit Abstand höchsten Expression von *Slc10a2* und *Slco1a1* auch eine mit 14.601 nmol/l vielfach höhere Plasmagallensäurenkonzentration aufwies als die der anderen drei Mäuse der Gruppe (2.643; 617; 414 nmol/l).

Dünndarm

In mehreren Studien mit Gallensäure-gefütterten Mäusen konnte bislang nachgewiesen werden, dass durch die erhöhte Gallensäurenkonzentration im enterohepatischen System die *Slc10a2*-Expression (ASBT) herunterreguliert wurde (Torchia et al. 1996; Chen et al. 2003; Frankenberg et al. 2006). Dies konnte in der Real-Time-PCR-Untersuchung der Ileumproben nicht bestätigt werden, bei der *Slc10a2* stabil unabhängig von Genotyp und Fütterung exprimiert wurde, auch wenn die Expressionswerte nach Cholsäurefütterung eine Tendenz niedriger ausfielen (siehe Abb. 4.38 A). Für das Transporterdimer OST α/β korreliert die Expression der beiden Einzelgene laut Frankenberg et al. (2006) sehr stark miteinander, und sie konnten nach 0,2 % Cholsäurefütterung ein Gleichbleiben der Expression im Ileum nachweisen. Vor diesem Hintergrund verwundert es, dass die *Osta*-mRNA-Expression entsprechend konstant blieb, aber *Ost β* bei den *Slc10a5*-Knockout-Mäusen vermehrt nach Cholsäurefütterung exprimiert wurde (siehe Abb. 4.38 A). Denn eine alleinige Erhöhung der Translation des OST β -Proteins würde ohne eine Erhöhung von OST α nicht zu einer Zunahme an funktionellen Transporterdimeren führen. Eine Erhöhung der OST α/β -Proteinexpression würde bei Cholsäurefütterung sinnvoll erscheinen, da die Cholsäure beim niedrigen pH-Wert des Darmes vorwiegend protoniert und somit gut membranpermeabel ist (siehe Abb. 5.3) und somit selbst bei verminderter ASBT-Proteinmenge passiv in die Zellen gelangen könnte. Im Zellinneren aber bei pH 7,2 verschiebt sich das Gleichgewicht zur geladenen Form, sodass Cholsäure die Zelle nicht mehr so effektiv verlassen kann und dort akkumulieren würde, wenn keine ausreichende Transporteraktivität von OST α/β vorläge. *Osta*-Knockoutmäuse, die mit 0,2 % Cholsäure gefüttert wurden, zeigen nämlich eine vermehrte Gallensäureausscheidung mit dem Kot

im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Rao et al. 2008), was eine Beteiligung am Export auch von Cholsäure aus den Enterozyten ins Blut vermuten lässt.

5.12.2 Gallensäuresynthese und Konjugation

Durch das konstante Zuführen von Cholsäure über den Darm wird das gesamte entero-hepatische System (Darm, Blut, Leberzellen) mit Gallensäuren übersättigt. Dadurch müsste in den Darmzellen FXR aktiviert werden und über FGF15 seine Wirkung auf die Genexpression von *Cyp7a1* ausüben, das für das Schlüsselenzym der Gallensäureneusynthese in der Leber codiert. Desweiteren sollte die Aktivierung des hepatischen FXR über SHP auch die Transkription der weiteren Gallensäuresyntheseenzyme wie *Cyp7b1*, *Cyp8b1* und *Cyp27a1* hemmen (Goodwin et al. 2000; Kalaany et al. 2006). Es wurde bereits die durch 1 % Cholsäurefütterung ausgelöste Herabregulation von *Cyp7a1* (Zollner et al. 2006b; Zhang et al. 2010), *Cyp7b1*, *Cyp8b1* und *Cyp27a1* gezeigt (Zhang et al. 2010). Dieser Regulationsmechanismus schien auch bei *Slc10a5*-Knockout- und Wildtyp-Mäusen zu greifen, da sowohl auf Genebene die sehr starke Reduktion der mRNA dieser Enzyme nachgewiesen wurde als auch die Konzentration von Chenodeoxycholat und Muricholat als neusynthetisierte Gallensäuren abnahmen (siehe Abb. 4.37 G und Abb. 4.35). Die diesen Mechanismen zugrunde liegende Regulation der Kernrezeptoren kann leider nicht vollständig nachvollzogen werden, da Informationen über ihren Aktivierungsgrad fehlen. In der *Gene-Array*-Analyse wurden jedoch die Expressionslevel auf mRNA-Ebene bestimmt. Bei Kontrollfütterung war die Expression von *Fxr* bei *Slc10a5*-Knockout- und Wildtyp-Mäusen identisch, und während sie bei Cholsäurefütterung bei den Wildtypen gleich blieb, stieg sie bei den Knockout-Mäusen an, wodurch sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen ergab. *Shp* zeigte in allen Gruppen eine gleichbleibende Expression. Eigentlich wurde eine Zunahme der Genexpression beider Kernrezeptoren erwartet. Denn im Zellkulturexperiment an humanen Hepatozyten wurde durch Inkubation mit Cholsäure sowohl die mRNA-Expression von FXR als auch SHP signifikant erhöht (Liu et al. 2014). Gerade bei SHP wäre eine Änderung durch die Cholsäurefütterung zu erwarten gewesen, denn in Studien beim Kaninchen zeigte sich, dass die Expression von SHP immer den Aktivierungszustand von FXR widerspiegelte (Xu et al. 2002).

Es wurde von einer Erhöhung der Expression der an der Konjugation von Gallensäuren sowohl *de novo* als auch Rekonjugation beteiligten Enzyme FATP2 und insbesondere FATP5 und BAAT ausgegangen. Es traten keine Unterschiede zwischen den *Slc10a5*-Knockout-Mäusen und den Wildtyp-Mäusen auf, jedoch wurde die Genexpression von *Slc27a2*

(FATP2), *Slc27a5* (FATP5) und *Baat* durch die Cholsäurefütterung signifikant erniedrigt. Ein Zusammenhang mit der Konjugationsfähigkeit kann deswegen hier nicht gesehen werden.

Die Expression von *Baat* und *Slc27a5* wird über HNF4 α (Inoue et al. 2004) und auch FXR stimuliert (Pircher et al. 2003). Eine Erniedrigung ihrer Expression sollte demnach durch eine Abnahme dieser aktivierten Kernrezeptoren oder durch eine zusätzliche Hemmung zustande kommen. Zumindest auf Ebene der Genexpression waren weder *Hnf4 α* noch *Fxr*, der sogar hochreguliert wurde, vermindert. Eine Erklärung kann anhand der für die Gallensäurefütterungsstudie vorliegenden Daten nicht gegeben werden. Im Vergleich sollte sich bei Cholestase ebenfalls entsprechend der Expression von Gallensäureexporttransportern auch eine Erhöhung der Genexpression der für die Konjugation benötigten Enzyme einstellen. Allerdings erhielt auch Zhang in seiner Dissertation widersprüchliche Ergebnisse, bei denen einen Tag nach Gallengangligatur die Expression von *Slc27a5* erniedrigt, die von *Baat* aber erhöht war. Bei ihm korrelierte die Zunahme der *Baat* tatsächlich mit einer erhöhten Konjugationsrate (Diss. Zhang 2011).

Es wurde gezeigt, dass eine Aktivierung von PPAR die Expression und Aktivität der BAAT senkt (Solaas et al. 2004). Dieser Mechanismus stellt sich aber nicht als wahrscheinliche Begründung für die Abnahme der Expression durch die Cholsäurefütterung dar. Denn die Genexpression von PPAR α wird durch die Cholsäurefütterung bei beiden Genotypen signifikant erniedrigt. Demnach erscheint es unwahrscheinlich, dass vermehrt aktivierter PPAR α die *Baat*-Transkription hemmt.

5.13 Ausblick

Die Lokalisation des SLC10A5-Proteins konnte im Zellkulturmodell an transfizierten Zellen im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat nachgewiesen werden. Dies gelang in natürlicherweise SLC10A5 exprimierenden Zellen jedoch nicht, und es bestehen starke Zweifel an der Spezifität der mitochondrialen Lokalisation im Gewebe von Ratte und Maus. Es ist deswegen zukünftig wichtig, einen spezifischen Maus-SLC10A5-Antikörper zu entwickeln, um mit Hilfe der *Slc10a5*-Knockout-Maus als Negativkontrolle sicher die Lokalisation bestimmen zu können.

Das Gallensäurefütterungsexperiment zeigte als größte Unterschiede zwischen den *Slc10a5*-Knockout- und den Wildtyp-Mäusen die verschiedenen hohen Konzentrationen an sekundären Gallensäuren und ein Konjugationsdefizit der Knockout-Mäuse. Um letzte Zweifel bezüglich des Einflusses der Mikroflora auszuräumen, sollten zukünftige Experimente mit Wurfgeschwistern durchgeführt werden. Es sollten außerdem die Gallensäurewerte von Lebergewebe, Pfortaderblut, Kot aus unterschiedlichen Darmabschnitten und Urin bestimmt werden, um eine komplette Bilanz erstellen zu können. Dadurch könnte auch die noch unbekannte Aufnahme rate von Cholat und sekundären Gallensäuren aus dem Darm besser aufgeklärt und die Bildung der sekundären Gallensäuren im Darm genauer untersucht werden. Außerdem könnte die intestinale Permeabilität *in vivo* durch *per os* Gabe von beispielsweise Laktulose und Messung der Konzentration im Urin bestimmt werden (Bischoff et al. 2014) und *post mortem* an isolierten Darmabschnitten im Organbad die Durchlässigkeit für Gallensäuren bestimmt werden. Natürlich wäre es zudem sinnvoll, die Konzentrationen von Taurin und CoenzymA im Lebergewebe zu untersuchen, um einen Mangel dieser Substanzen als Grund für das Konjugationsdefizit ausschließen zu können.

Um die Konjugationsfähigkeit der *Slc10a5*-Knockout-Mäuse besser zu untersuchen, könnte *in vivo* bei *Slc10a5*-Knockout-Mäusen verglichen mit der Wildtypkontrolle Cholsäure intravenös appliziert und zeitabhängig der Anteil der konjugierten Gallensäuren in Leber und Galle gemessen werden. *In vitro* ließe sich an Hepatozyten die Konjugationsfähigkeit überprüfen, indem nach Inkubation mit Cholsäure sowohl Gallensäure-CoenzymA-Verbindungen als auch konjugierte Gallensäuren bestimmt werden. Messungen zur Transportaktivität *in vitro* sollten mit Gallensäure-CoenzymA-Verbindungen ergänzt werden.

Aufgrund der bei der *Slc10a5*-Knockout-Maus beobachteten Gewichtsunterschiede sollten die Untersuchungen um eine weitergehende Charakterisierung des Energiemetabolismus ergänzt werden. Hierfür würden sich die Untersuchung der Energiebilanz im Stoffwechselkäfig und die Bestimmung von Fettsäuren und Blutglucose eignen.

6 Zusammenfassung

SLC10A5 wurde nach seiner Entdeckung aufgrund von Sequenzhomologie in die SLC10-Familie, auch Familie der Na⁺-abhängigen Gallensäuretransporter genannt, eingeordnet. Er wurde als potenzieller Gallensäuretransporter angesehen, da sich zusätzlich sein Expressionsprofil, das die höchsten Werte in Leber, Niere und Magen-Darm-Trakt zeigte, mit den gut charakterisierten Gründungsmitgliedern NTCP und ASBT überschneidet, welche zusammen den enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren aufrechterhalten. Jedoch wurde bislang keine Transportaktivität für Gallensäuren aufgezeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig die Lokalisation und Funktion des SLC10A5 näher untersucht. Das SLC10A5-Protein von Mensch, Maus und Ratte wurde in transfizierten HEK293- und HepG2-Zellen intrazellulär im Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat nachgewiesen. Die Lokalisation auf subzellulärer Ebene konnte im Gewebe nicht abschließend geklärt werden, da zwei eingesetzte kommerzielle Antikörper gegen das humane SLC10A5-Protein keine spezifische Bindung aufwiesen und ein gegen den C-Terminus des SLC10A5 der Ratte generierter Antikörper in Immunhistologie- und Western-Blot-Analysen an Ratten- und Mausgewebe Mitochondrien markierte, jedoch auch mit dem Gewebe der *Slc10a5*-Knockoutmaus reagierte. *In vitro* konnte an mit humanem SLC10A5-V5-transfizierten HEK293-Zellen weder mit radioaktiv- noch mit fluoreszenzmarkierten Gallensäuren eine Transportfunktion nachgewiesen werden.

Mit der *Slc10a5*-Knockout-Maus (B6.129S5-*Slc10a5*^{tm1Lex}) stand jedoch ein *In-vivo*-Modell zur Aufklärung der physiologischen SLC10A5-Funktion zur Verfügung. Unter Standardhaltungsbedingungen zeigten die homozygot-defekten Mäuse allerdings keinen auffälligen Phänotyp, sondern waren trotz geringfügig geringeren Körpergewichts gesund und fertil. Durch einwöchige Fütterung mit 0,5 % Cholsäure-haltiger Diät konnten signifikante Unterschiede zwischen den *Slc10a5*-Knockout-Mäusen und den C57BL/6N-Kontroll-Mäusen induziert werden. Die Gallen- und Plasmazusammensetzung wurde mittels UHPLC-MS/MS bestimmt. Unter Kontrollfütterung glichen sich Gallemenge, Gallensäure-, Phospholipid und Cholesterinkonzentrationen und ließen sich durch die Fütterung mit Cholsäure bei beiden Genotypen erhöhen. Jedoch schieden die Knockout-Mäuse bei gleicher Gesamtgallensäurekonzentration zwanzig Mal soviel unkonjugierte Gallensäuren wie die Wildtypmäuse aus, was auf eine begrenzte Fähigkeit hindeutet, Gallensäuren zu rekonjugieren. Zusätzlich verschob sich das bei Kontrollfütterung zwischen den Genotypen gleiche Verhältnis der Gallensäuren mit Taurocholat, Tauromurocholat, Tauro-7-Deoxycholat und Taurodeoxycholat als Hauptgallensäuren durch die Fütterung mit Cholsäure. Taurocholat stellte weiterhin den größten Anteil dar, aber

während bei den Wildtyp-Mäusen Taurodeoxycholat circa ein Viertel der Gallensäuren ausmachte, sank der Anteil bei den Knockout-Mäusen auf unter 1 %, welche dafür zu etwa einem Viertel Cholat und einen vermehrten (Tauro-)7-oxo-Deoxycholat-Gehalt aufwiesen. Einher gingen diese Cholsäure-induzierten Veränderungen mit einer Hyperämie und Schwellung des Dünndarms bei den Knockout-Mäusen.

Bei Standardhaltung der *Slc10a5*-Knockout-Mäuse konnten keine Unterschiede in der Genexpression von Gallensäuretransportern oder der in Synthese und Metabolismus involvierten Enzyme in einer genomweiten Array-Analyse der Leber-RNA detektiert werden. Die Cholsäurefütterung induzierte Anpassungen der Genexpression in beiden Genotypen, jedoch nur geringe Expressionsunterschiede zwischen den Knockout- und Wildtypmäusen, welche nicht in der Lage sind, den beschriebenen Phänotyp zu erklären. Ein Einfluss des SLC10A5 auf den Prozess der Rekonjugation von Gallensäuren in der Leber ist somit wahrscheinlich, jedoch muss seine physiologische Funktion – auch in den anderen hoch-exprimierenden Geweben – weiter aufgeklärt werden.

7 Summary

After its discovery SLC10A5 was classified as a member of the SLC10-family (family of sodium-dependent bile acid transporters) due to sequence homology. It was regarded as a potential bile acid transporter because its expression profiles, showing the highest expression in liver, kidney, and the gastro intestinal tract, greatly overlapped with NTCP and ASBT that together build up the enterohepatic circulation of bile acids. However, no transport activity for bile acids has been shown yet.

In the present thesis the localization and function of SLC10A5 was examined for the first time. The SLC10A5 protein of human, mouse, and rat was sorted intracellular into the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus when transiently transfected in HEK293 and HepG2 cells. Subcellular localization could not be finally evaluated due to unspecific binding of two commercial antibodies. In addition, a custom made antibody raised against the C-terminus of the rat's SLC10A5 protein specifically marked mitochondria in immunohistology and Western Blot analysis of rat and mouse tissue but also reacted with tissue of the *Slc10a5* knockout mouse. In vitro no transport function in SLC10A5-V5 transfected HEK293 cells could be observed, neither with radioactive nor fluorescent bile acids.

However, the *Slc10a5* knockout mouse (B6.129S5-Slc10a5tm1Lex) represented an in vivo model to study the physiological function of SLC10A5. Under standard conditions the homozygous knockout mice showed no phenotype though, but were instead healthy and fertile with

only slightly decreased body weight. One week of 0.5 % cholic acid feeding induced significant differences between the *Slc10a5* knockout mice and the C57BL/6N control strain. Bile and plasma composition was measured by UHPLC-MS/MS. Fed the control diet, the total amount of bile, bile acid, phospholipid and cholesterol concentrations were similar in both genotypes but increased with cholic acid feeding. Cholic acid fed *Slc10a5* knockout mice, however, excreted 20-fold more unconjugated bile acids into the bile than the wildtype control group, although the overall bile acid concentration of the bile was identical between both strains, pointing to limited bile acid reconjugation. Furthermore, the equal ratio of bile acids between the different genotypes during control diet feeding (with taurocholate, tauromurocholate, tauro-7-oxo-cholate, and taurodeoxycholate as main bile acids) shifted after cholic acid feeding. Taurocholate still made up for the main proportion of bile acids, but while taurodeoxycholate counted for one fourth of total bile acids in the wildtype mice the amount decreased to less than 1 % in the knockout mice. Instead, the knockout mice excreted about one fourth unconjugated cholate and increased amounts of (tauro) 7-oxo-deoxycholate. These observations went together with cholic acid induced hyperaemia and swelling of the small intestinal wall of the knockout mice.

Under standard conditions no differences in gene expression of bile acid transporters or enzymes involved in synthesis and metabolism of bile acids were detected using a whole genome array analysis of liver RNA. Cholic acid feeding induced changes in both genotypes with slight differences between knockout and wildtype mice, but could not explain the indicated phenotype of knockouts. This leads to the hypothesis that SLC10A5 is involved in the reconjugation of bile acids in liver. However, its physiological role – also in the other highly expressing tissues – has to be further examined.

8 Literaturverzeichnis

- Abramov, U., Puusaar, T., Raud, S., Kurrikoff, K., Vasar, E. (2008) Behavioural differences between C57BL/6 and 129S6/SvEv strains are reinforced by environmental enrichment. *Neurosci.Lett.* 443:223-227.
- Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., Knowles, B. B. (1979) Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282:615-616.
- Agellon, L. B. (2002) Metabolism and function of bile acids. In: Vance, D. E. und Vance, J. E. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 433-448.
- Agellon, L. B., und Torchia, E. C. (2000) Intracellular transport of bile acids. *Biochim.Biophys.Acta* 1486:198-209.
- Alber, J., Jiang, L., Geyer, J. (2013) CaRch1p does not functionally interact with the high-affinity Ca(2+) influx system (HACS) of *Candida albicans*. *Yeast* 30:449-457.
- Alcalay, M., und Toniolo, D. (1988) CpG islands of the X chromosome are gene associated. *Nucleic Acids Res.* 16:9527-9543.
- Allen Brain Atlas, Mouse Brain
<http://mouse.brain-map.org> (Stand: 11.04.2015)
- Alnouti, Y., Csanaky, I. L., Klaassen, C. D. (2008) Quantitative-profiling of bile acids and their conjugates in mouse liver, bile, plasma, and urine using LC-MS/MS. *J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.* 873:209-217.
- Alrefai, W. A., und Gill, R. K. (2007) Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharm.Res.* 24:1803-1823.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* 215:403-410.
- Alvaro, D., Benedetti, A., Gigliozi, A., Bini, A., Furfaro, S., Bassotti, C., La Rosa T., Jezequel, A. M., Capocaccia, L. (1995) Effect of Brefeldin A on transcytotic vesicular pathway and bile secretion: a study on the isolated perfused rat liver and isolated rat hepatocyte couplets. *Hepatology* 21:450-459.
- Ansar, A. A. (2009) Regulation of metabolizing enzymes and transporters for drugs and bile salts in human and rat intestine and liver – a study with precision-cut slices. Dissertation: Fachbereich Wiskunde en Natuurwetenschappen der Rijksuniversiteit Groningen.
<http://irs.ub.rug.nl/ppn/323040454>.
- Aoyama, N., Ohya, T., Chandler, K., Gresky, S., Holzbach, R. T. (1991) Transcellular transport of organic anions in the isolated perfused rat liver: the differential effects of monensin and colchicine. *Hepatology* 14:1-9.
- Attili, A. F., Angelico, M., Cantafora, A., Alvaro, D., Capocaccia, L. (1986) Bile acid-induced liver toxicity: relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids. *Med.Hypotheses* 19:57-69.
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., Gordon, J. I. (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307:1915-1920.
- Bijsmans, I. T., Bouwmeester, R. A., Geyer, J., Faber, K. N., van de Graaf, S. F. (2012) Homo- and hetero-dimeric architecture of the human liver Na(+)-dependent taurocholate co-transporting protein. *Biochem.J.* 441:1007-1015.

- Bischoff, S. C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J. D., Serino, M., Tilg, H., Watson, A., Wells, J. M. (2014) Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC.Gastroenterol.* 14:189.
- Briesemeister, S., Rahnenfuhrer, J., Kohlbacher, O. (2010a) Going from where to why – interpretable prediction of protein subcellular localization. *Bioinformatics.* 26:1232-1238.
- Briesemeister, S., Rahnenfuhrer, J., Kohlbacher, O. (2010b) YLoc – an interpretable web server for predicting subcellular localization. *Nucleic Acids Res.* 38:W497-W502.
- Bryant, N. J., Govers, R., James, D. E. (2002) Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 3:267-277.
- Buch, C., Hunt, M. C., Alexson, S. E., Hallberg, E. (2009) Localization of peroxisomal matrix proteins by photobleaching. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 388:355-359.
- Burger, S., Doring, B., Hardt, M., Beuerlein, K., Gerstberger, R., Geyer, J. (2011) Co-expression studies of the orphan carrier protein Slc10a4 and the vesicular carriers VACHT and VMAT2 in the rat central and peripheral nervous system. *Neuroscience* 193:109-121.
- Cabral, D. J., Hamilton, J. A., Small, D. M. (1986) The ionization behavior of bile acids in different aqueous environments. *J.Lipid Res.* 27:334-343.
- Carulli, N., Bertolotti, M., Carubbi, F., Concari, M., Martella, P., Carulli, L., Loria, P. (2000) Review article: effect of bile salt pool composition on hepatic and biliary functions. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 14 Suppl 2:14-18.
- Casey, J. R., Grinstein, S., Orlowski, J. (2010) Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 11:50-61.
- Castro-Perez, J. M., Roddy, T. P., Shah, V., Wang, S. P., Ouyang, X., Ogawa, A., McLaren, D. G., Tadin-Strapps, M., Robinson, M. J., Bartz, S. R., Ason, B., Chen, Y., Previs, S. F., Wong, K. K., Vreeken, R. J., Johns, D. G., Hubbard, B. K., Hankemeier, T., Mitnaul, L. (2011) Attenuation of Slc27a5 gene expression followed by LC-MS measurement of bile acid reconjugation using metabolomics and a stable isotope tracer strategy. *J.Proteome.Res.* 10:4683-4691.
- Chadwick, V. S., Gaginella, T. S., Carlson, G. L., Debonignie, J. C., Phillips, S. F., Hofmann, A. F. (1979) Effect of molecular structure on bile acid-induced alterations in absorptive function, permeability, and morphology in the perfused rabbit colon. *J.Lab Clin.Med.* 94:661-674.
- Chen, F., Ma, L., Dawson, P. A., Sinal, C. J., Sehayek, E., Gonzalez, F. J., Breslow, J., Ananthanarayanan, M., Shneider, B. L. (2003) Liver receptor homologue-1 mediates species- and cell line-specific bile acid-dependent negative feedback regulation of the apical sodium-dependent bile acid transporter. *J.Biol.Chem.* 278:19909-19916.
- Cheng, X., Maher, J., Lu, H., Klaassen, C. D. (2006) Endocrine regulation of gender-divergent mouse organic anion-transporting polypeptide (Oatp) expression. *Mol.Pharmacol.* 70:1291-1297.
- Chiang, J. Y. (2004) Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J.Hepatol.* 40:539-551.
- Chiang, J. Y. (2009) Bile acids: regulation of synthesis. *J.Lipid Res.* 50:1955-1966.
- Chou, K. C., und Shen, H. B. (2010) A new method for predicting the subcellular localization of eukaryotic proteins with both single and multiple sites: Euk-mPLoc 2.0. *PLoS.One.* 5:e9931.

- Craddock, A. L., Love, M. W., Daniel, R. W., Kirby, L. C., Walters, H. C., Wong, M. H., Dawson, P. A. (1998) Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am.J.Physiol* 274:G157-G169.
- Crawford, J. M. (1996) Role of vesicle-mediated transport pathways in hepatocellular bile secretion. *Semin.Liver Dis.* 16:169-189.
- Crawford, J. M., Barnes, S., Stearns, R. C., Hastings, C. L., Godleski, J. J. (1994a) Ultrastructural localization of a fluorinated bile salt in hepatocytes. *Lab Invest* 71:42-51.
- Crawford, J. M., Crawford, A. R., Strahs, D. C. (1993) Microtubule-dependent transport of bile salts through hepatocytes: cholic vs. taurocholic acid. *Hepatology* 18:903-911.
- Crawford, J. M., Strahs, D. C., Crawford, A. R., Barnes, S. (1994b) Role of bile salt hydrophobicity in hepatic microtubule-dependent bile salt secretion. *J.Lipid Res.* 35:1738-1748.
- Csanaky, I. L., Lu, H., Zhang, Y., Ogura, K., Choudhuri, S., Klaassen, C. D. (2011) Organic anion-transporting polypeptide 1b2 (Oatp1b2) is important for the hepatic uptake of unconjugated bile acids: Studies in Oatp1b2-null mice. *Hepatology* 53:272-281.
- Dawson, P. A., Haywood, J., Craddock, A. L., Wilson, M., Tietjen, M., Kluckman, K., Maeda, N., Parks, J. S. (2003a) Targeted deletion of the ileal bile acid transporter eliminates enterohepatic cycling of bile acids in mice. *J.Biol.Chem.* 278:33920-33927.
- Dawson, P. A., Lan, T., Rao, A. (2009) Bile acid transporters. *J.Lipid Res.* 50:2340-2357.
- Deeg, M. A. (2003) Dietary cholate is required for antiatherogenic effects of ethanol in mouse models. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 27:1499-1506.
- Deroubaix, X., Coche, T., Depiereux, E., Feytmans, E. (1991) Saturation of hepatic transport of taurocholate in rats in vivo. *Am.J.Physiol* 260:G189-G196.
- Dietrich, A., Dieminger, W., Fuchte, K., Stoll, G. H., Schlitz, E., Gerok, W., Kurz, G. (1995) Functional significance of interaction of H-FABP with sulfated and nonsulfated taurine-conjugated bile salts in rat liver. *J.Lipid Res.* 36:1745-1755.
- Dietschy, J. M. (1968) Mechanisms for the intestinal absorption of bile acids. *J.Lipid Res.* 9:297-309.
- Doege, H., Baillie, R. A., Ortegon, A. M., Tsang, B., Wu, Q., Punreddy, S., Hirsch, D., Watson, N., Gimeno, R. E., Stahl, A. (2006a) Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis. *Gastroenterology* 130:1245-1258.
- Doege, H., und Stahl, A. (2006b) Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology.(Bethesda.)* 21:259-268.
- Dranoff, J. A., McClure, M., Burgstahler, A. D., Denson, L. A., Crawford, A. R., Crawford, J. M., Karpen, S. J., Nathanson, M. H. (1999) Short-term regulation of bile acid uptake by microfilament-dependent translocation of rat ntcp to the plasma membrane. *Hepatology* 30:223-229.
- Dubos, R., Schaedler, R. W., Costello, R., Hoet, P. (1965) Indigeneous, normal, and autochthonous flora of the gastrointestinal tract. *J.Exp.Med.* 122:67-76.

- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne G., Nielsen, H. (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat.Protoc.* 2:953-971.
- Erickson, J. D., Eiden, L. E., Hoffman, B. J. (1992) Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:10993-10997.
- Ericsson, A. C., Davis, J. W., Spollen, W., Bivens, N., Givan, S., Hagan, C. E., McIntosh, M., Franklin, C. L. (2015) Effects of Vendor and Genetic Background on the Composition of the Fecal Microbiota of Inbred Mice. *PLoS.One.* 10:e0116704.
- Eurexpress – A Transcriptome Atlas Database for Mouse Embryo
<http://www.eurexpress.org> (Stand: 11.04.2015)
- Falany, C. N., Fortinberry, H., Leiter, E. H., Barnes, S. (1997) Cloning, expression, and chromosomal localization of mouse liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase. *J.Lipid Res.* 38:1139-1148.
- Fallingborg, J. (1999) Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Dan.Med.Bull.* 46:183-196.
- Fasano, A., Budillon, G., Guandalini, S., Cuomo, R., Parrilli, G., Cangiotti, A. M., Morroni, M., Rubino, A. (1990) Bile acids reversible effects on small intestinal permeability. An in vitro study in the rabbit. *Dig.Dis Sci.* 35:801-808.
- Ferdinandusse, S., Denis, S., Faust, P. L., Wanders, R. J. (2009) Bile acids: the role of peroxisomes. *J.Lipid Res.* 50:2139-2147.
- Fernandes, C. F. (2007) Molecular Characterization and Expression of Two New Members of the SLC10 Transporter Family: SLC10A4 and SLC10A5. Dissertation: Fachbereich Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg.
<http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z2008/0003>.
- Fernandes, C. F., Godoy, J. R., Doring, B., Cavalcanti, M. C., Bergmann, M., Petzinger, E., Geyer, J. (2007) The novel putative bile acid transporter SLC10A5 is highly expressed in liver and kidney. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 361:26-32.
- Fickert, P., Zollner, G., Fuchsbichler, A., Stumptner, C., Pojer, C., Zenz, R., Lammert, F., Stieger, B., Meier, P. J., Zatloukal, K., Denk, H., Trauner, M. (2001) Effects of ursodeoxycholic and cholic acid feeding on hepatocellular transporter expression in mouse liver. *Gastroenterology* 121:170-183.
- Field, M. (1993) Bile salt-induced diarrhea: the cellular mechanism. *J.Clin.Invest* 92:2091.
- Fini, A., und Roda, A. (1987) Chemical properties of bile acids. IV. Acidity constants of glycine-conjugated bile acids. *J.Lipid Res.* 28:755-759.
- Frankenberg, T., Rao, A., Chen, F., Haywood, J., Shneider, B. L., Dawson, P. A. (2006) Regulation of the mouse organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, by bile acids. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 290:G912-G922.
- Frezza, C., Cipolat, S., Scorrano, L. (2007) Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat.Protoc.* 2:287-295.
- Fu, Z. D., Csanaky, I. L., Klaassen, C. D. (2012) Gender-divergent profile of bile acid homeostasis during aging of mice. *PLoS.One.* 7:e32551.

- Fukiya, S., Arata, M., Kawashima, H., Yoshida, D., Kaneko, M., Minamida, K., Watanabe, J., Ogura, Y., Uchida, K., Itoh, K., Wada, M., Ito, S., Yokota, A. (2009) Conversion of cholic acid and chenodeoxycholic acid into their 7-oxo derivatives by *Bacteroides intestinalis* AM-1 isolated from human feces. *FEMS Microbiol.Lett.* 293:263-270.
- Galle, P. R., Theilmann, L., Raedsch, R., Otto, G., Stiehl, A. (1990) Ursodeoxycholate reduces hepatotoxicity of bile salts in primary human hepatocytes. *Hepatology* 12:486-491.
- Geier, A., Dietrich, C. G., Trauner, M., Gartung, C. (2007) Extrahepatic cholestasis downregulates Oatp1 by TNF-alpha signalling without affecting Oatp2 and Oatp4 expression and sodium-independent bile salt uptake in rat liver. *Liver Int.* 27:1056-1065.
- Gelbe Liste Pharmaindex
<http://www.gelbe-liste.de> (Suchbegriff: Ursodeoxycholsäure, Stand: 24.02.2015)
- Geyer, J., Doring, B., Meerkamp, K., Ugele, B., Bakhiya, N., Fernandes, C. F., Godoy, J. R., Glatt, H., Petzinger, E. (2007) Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6). *J.Biol.Chem.* 282:19728-19741.
- Geyer, J., Fernandes, C. F., Doring, B., Burger, S., Godoy, J. R., Rafalzik, S., Hubschle, T., Gerstberger, R., Petzinger, E. (2008) Cloning and molecular characterization of the orphan carrier protein Slc10a4: expression in cholinergic neurons of the rat central nervous system. *Neuroscience* 152:990-1005.
- Geyer, J., Wilke, T., Petzinger, E. (2006) The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 372:413-431.
- Godoy, J. R., Fernandes, C., Doring, B., Beuerlein, K., Petzinger, E., Geyer, J. (2007) Molecular and phylogenetic characterization of a novel putative membrane transporter (SLC10A7), conserved in vertebrates and bacteria. *Eur.J.Cell Biol.* 86:445-460.
- Goerg, K. J., Nell, G., Rummel, W. (1983) Effect of deoxycholate on the perfused rat colon. Concentration dependence of the effect on net fluid and electrolyte transfer and the correlation with paracellular permeability. *Digestion* 26:105-113.
- Goodwin, B., Jones, S. A., Price, R. R., Watson, M. A., McKee, D. D., Moore, L. B., Galardi, C., Wilson, J. G., Lewis, M. C., Roth, M. E., Maloney, P. R., Willson, T. M., Kliewer, S. A. (2000) A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol.Cell* 6:517-526.
- Graf, G. A., Yu, L., Li, W. P., Gerard, R., Tuma, P. L., Cohen, J. C., Hobbs, H. H. (2003) ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J.Biol.Chem.* 278:48275-48282.
- Gray, K. A., Yates, B., Seal, R. L., Wright, M. W., Bruford, E. A. (2015) Genenames.org: the HGNC resources in 2015. *Nucleic Acids Res.* 43:D1079-D1085.
- Grisham, J. W. (2009) Organizational Principles of the Liver. *The Liver: Biology and Pathobiology.* 1-15.
- Gu, S., Chen, D., Zhang, J. N., Lv, X., Wang, K., Duan, L. P., Nie, Y., Wu, X. L. (2013) Bacterial community mapping of the mouse gastrointestinal tract. *PLoS.One.* 8:e74957.
- Gupta, S., Todd, Stravitz R., Pandak, W. M., Muller, M., Reno, Vlahcevic Z., Hylemon, P. B. (2000) Regulation of multidrug resistance 2 P-glycoprotein expression by bile salts in rats and in primary cultures of rat hepatocytes. *Hepatology* 32:341-347.

- Hagenbuch, B., und Meier, P. J. (1994) Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J.Clin.Invest* 93:1326-1331.
- Hagenbuch, B., und Stieger, B. (2013) The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. *Mol.Aspects Med.* 34:396-412.
- Hagenbuch, B., Stieger, B., Foguet, M., Lubbert, H., Meier, P. J. (1991) Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88:10629-10633.
- Hamilton, J. P., Xie, G., Raufman, J. P., Hogan, S., Griffin, T. L., Packard, C. A., Chatfield, D. A., Hagey, L. R., Steinbach, J. H., Hofmann, A. F. (2007) Human cecal bile acids: concentration and spectrum. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 293:G256-G263.
- Hartner, A., Cordasic, N., Klanke, B., Veelken, R., Hilgers, K. F. (2003) Strain differences in the development of hypertension and glomerular lesions induced by deoxycorticosterone acetate salt in mice. *Nephrol.Dial.Transplant.* 18:1999-2004.
- Heinzer, A. K., Watkins, P. A., Lu, J. F., Kemp, S., Moser, A. B., Li, Y. Y., Mihalik, S., Powers, J. M., Smith, K. D. (2003) A very long-chain acyl-CoA synthetase-deficient mouse and its relevance to X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum.Mol.Genet.* 12:1145-1154.
- Herold, G., and colleagues (2010) Herold's internal medicine: a lecture oriented systematic and accurate representation of the complete topic catalogue for the medical examination for physicians Vol. 2:75.
- Heuman, D. M. (1989) Quantitative estimation of the hydrophilic-hydrophobic balance of mixed bile salt solutions. *J.Lipid Res.* 30:719-730.
- Heuman, D. M., Hylemon, P. B., Vlahcevic, Z. R. (1989) Regulation of bile acid synthesis. III. Correlation between biliary bile salt hydrophobicity index and the activities of enzymes regulating cholesterol and bile acid synthesis in the rat. *J.Lipid Res.* 30:1161-1171.
- HGNC Database, HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC), EMBL Outstation – Hinxton, European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, CB10 1SD, UK
<http://www.genenames.org> (Stand: 07.03.2015)
- Higuchi, H. und Gores, G. J. (2004) Bile acid-mediated apoptosis in cholestasis. In: Trauner, M., und Jansen, P. L. M. *Molecular pathogenesis of cholestasis.* 126-134.
- Hiller, K., Grote, A., Scheer, M., Munch, R., Jahn, D. (2004) PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions. *Nucleic Acids Res.* 32:W375-W379.
- Hofmann, A. F. (1984) Chemistry and enterohepatic circulation of bile acids. *Hepatology* 4:4-14.
- Hofmann, A. F. (2009a) Chronic diarrhea caused by idiopathic bile acid malabsorption: an explanation at last. *Expert.Rev.Gastroenterol.Hepatol.* 3:461-464.
- Hofmann, A. F. (2009b) Bile Acids and the Enterohepatic Circulation. In: Arias, I. M. *The Liver: Biology and Pathobiology.* 287-304.
- Hofmann, A. F., und Hagey, L. R. (2008) Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell Mol.Life Sci.* 65:2461-2483.
- Hofmann, A. F., Hagey, L. R., Krasowski, M. D. (2010) Bile salts of vertebrates: structural variation and possible evolutionary significance. *J.Lipid Res.* 51:226-246.

- Hofmann, A. F., und Roda, A. (1984) Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: an overview of the problem. *J.Lipid Res.* 25:1477-1489.
- Hoglund, A., Donnes, P., Blum, T., Adolph, H. W., Kohlbacher, O. (2006) MultiLoc: prediction of protein subcellular localization using N-terminal targeting sequences, sequence motifs and amino acid composition. *Bioinformatics.* 22:1158-1165.
- Holzinger, F., Schteingart, C. D., Ton-Nu, H. T., Eming, S. A., Monte, M. J., Hagey, L. R., Hofmann, A. F. (1997) Fluorescent bile acid derivatives: relationship between chemical structure and hepatic and intestinal transport in the rat. *Hepatology* 26:1263-1271.
- Hsiao, A., Ahmed, A. M., Subramanian, S., Griffin, N. W., Drewry, L. L., Petri Jr., W. A., Haque, R., Ahmed, T., Gordon, J. I. (2014) Members of the human gut microbiota involved in recovery from *Vibrio cholerae* infection. *Nature* 515:423-426.
- Hubbard, B., Doege, H., Punreddy, S., Wu, H., Huang, X., Kaushik, V. K., Mozell, R. L., Byrnes, J. J., Stricker-Krongrad, A., Chou, C. J., Tartaglia, L. A., Lodish, H. F., Stahl, A., Gimeno, R. E. (2006) Mice deleted for fatty acid transport protein 5 have defective bile acid conjugation and are protected from obesity. *Gastroenterology* 130:1259-1269.
- Huber, R. M., Murphy, K., Miao, B., Link, J. R., Cunningham, M. R., Rupa, M. J., Gunyuzlu, P. L., Haws, T. F., Kassam, A., Powell, F., Hollis, G. F., Young, P. R., Mukherjee, R., Burn, T. C. (2002) Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters. *Gene* 290:35-43.
- Human Metabolome Database
<http://www.hmdb.ca> (Stand: 11.04.2015)
- Hunt, M. C., und Alexson, S. E. (2002a) The role Acyl-CoA thioesterases play in mediating intracellular lipid metabolism. *Prog.Lipid Res.* 41:99-130.
- Hunt, M. C., Siponen, M. I., Alexson, S. E. (2012) The emerging role of acyl-CoA thioesterases and acyltransferases in regulating peroxisomal lipid metabolism. *Biochim.Biophys.Acta* 1822:1397-1410.
- Hunt, M. C., Solaas, K., Kase, B. F., Alexson, S. E. (2002b) Characterization of an acyl-coA thioesterase that functions as a major regulator of peroxisomal lipid metabolism. *J.Biol.Chem.* 277:1128-1138.
- Inoue, Y., Yu, A. M., Inoue, J., Gonzalez, F. J. (2004) Hepatocyte nuclear factor 4alpha is a central regulator of bile acid conjugation. *J.Biol.Chem.* 279:2480-2489.
- Inoue, Y., Yu, A. M., Yim, S. H., Ma, X., Krausz, K. W., Inoue, J., Xiang, C. C., Brownstein, M. J., Eggertsen, G., Bjorkhem, I., Gonzalez, F. J. (2006) Regulation of bile acid biosynthesis by hepatocyte nuclear factor 4alpha. *J.Lipid Res.* 47:215-227.
- International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice, Chair: Eppig, T. J. (2014) Guidelines for Nomenclature of Genes, Genetic Markers, Alleles, and Mutations in Mouse and Rat.
<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml#ps> (Stand: 14.04.2015)
- Itoh, K., und Narushima, S. (2005) Intestinal flora of animal models of human diseases as an environmental factor. *Curr.Issues Intest.Microbiol.* 6:9-15.
- Jiang, L., Alber, J., Wang, J., Du, W., Yang, X., Li, X., Sanglard, D., Geyer, J. (2012) The *Candida albicans* plasma membrane protein Rch1p, a member of the vertebrate SLC10 carrier family, is a novel regulator of cytosolic Ca²⁺ homeostasis. *Biochem.J.* 444:497-502.

- Jin, Y., Stayrook, S. E., Albert, R. H., Palackal, N. T., Penning, T. M., Lewis, M. (2001) Crystal structure of human type III 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/bile acid binding protein complexed with NADP(+) and ursodeoxycholate. *Biochemistry* 40:10161-10168.
- Jolley, C. D., Dietschy, J. M., Turley, S. D. (1999) Genetic differences in cholesterol absorption in 129/Sv and C57BL/6 mice: effect on cholesterol responsiveness. *Am.J.Physiol* 276:G1117-G1124.
- Jung, D., und Kullak-Ublick, G. A. (2003) Hepatocyte nuclear factor 1 α : a key mediator of the effect of bile acids on gene expression. *Hepatology* 37:622-631.
- Kalaany, N. Y., und Mangelsdorf, D. J. (2006) LXRS and FXR: the yin and yang of cholesterol and fat metabolism. *Annu.Rev.Physiol* 68:159-191.
- Keely, S. J., Scharl, M. M., Bertelsen, L. S., Hagey, L. R., Barrett, K. E., Hofmann, A. F. (2007) Bile acid-induced secretion in polarized monolayers of T84 colonic epithelial cells: Structure-activity relationships. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol.* 292:G290-G297.
- Kirkby, B., Roman, N., Kobe, B., Kellie, S., Forwood, J. K. (2010) Functional and structural properties of mammalian acyl-coenzyme A thioesterases. *Prog.Lipid Res.* 49:366-377.
- Kitamura, T., Gatmaitan, Z., Arias, I. M. (1990) Serial quantitative image analysis and confocal microscopy of hepatic uptake, intracellular distribution and biliary secretion of a fluorescent bile acid analog in rat hepatocyte doublets. *Hepatology* 12:1358-1364.
- Klaassen, C. D., und Aleksunes, L. M. (2010) Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol.Rev.* 62:1-96.
- Koopman, J. P., Kennis, H. M., Mullink, J. W., Prins, R. A., Stadhouders, A. M., De Boer, H., Hectors, M. P. (1984) 'Normalization' of germfree mice with anaerobically cultured caecal flora of 'normal' mice. *Lab Anim* 18:188-194.
- Kramer, W., Stengelin, S., Baringhaus, K. H., Enhsen, A., Heuer, H., Becker, W., Corsiero, D., Girbig, F., Noll, R., Weyland, C. (1999) Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na(+)/bile acid cotransporters of the rabbit. I. Transport studies with membrane vesicles and cell lines expressing the cloned transporters. *J.Lipid Res.* 40:1604-1617.
- Kühnel, W. (2008) Taschenatlas Histologie. Thieme.
- Lefebvre, P., Cariou, B., Lien, F., Kuipers, F., Staels, B. (2009) Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev.* 89:147-191.
- Leonardi, R., Zhang, Y. M., Rock, C. O., Jackowski, S. (2005) Coenzyme A: back in action. *Prog.Lipid Res.* 44:125-153.
- Liebich, H. G. (2010) Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel. Schattauer.
- Linnet, K. (1983) Postprandial plasma concentrations of glycine and taurine conjugated bile acids in healthy subjects. *Gut* 24:249-252.
- Liu, J., Lu, H., Lu, Y. F., Lei, X., Cui, J. Y., Ellis, E., Strom, S. C., Klaassen, C. D. (2014) Potency of individual bile acids to regulate bile Acid synthesis and transport genes in primary human hepatocyte cultures. *Toxicol.Sci.* 141:538-546.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193:265-275.
- Lu, X., Li, N., Shushakova, N., Schmitt, R., Menne, J., Susnik, N., Meier, M., Leitges, M., Haller, H., Gueler, F., Rong, S. (2012) C57BL/6 and 129/Sv mice: genetic difference to renal ischemia-reperfusion. *J.Nephrol.* 25:738-743.

- Makishima, M., Lu, T. T., Xie, W., Whitfield, G. K., Domoto, H., Evans, R. M., Haussler, M. R., Mangelsdorf, D. J. (2002) Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* 296:1313-1316.
- Makishima, M., Okamoto, A. Y., Repa, J. J., Tu, H., Learned, R. M., Luk, A., Hull, M. V., Lustig, K. D., Mangelsdorf, D. J., Shan, B. (1999) Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284:1362-1365.
- Mardones, P., Quinones, V., Amigo, L., Moreno, M., Miquel, J. F., Schwarz, M., Miettinen, H. E., Trigatti, B., Krieger, M., VanPatten, S., Cohen, D. E., Rigotti, A. (2001) Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *J.Lipid Res.* 42:170-180.
- Martin, F. P., Dumas, M. E., Wang, Y., Legido-Quigley, C., Yap, I. K., Tang, H., Zirah, S., Murphy, G. M., Cloarec, O., Lindon, J. C., Sprenger, N., Fay, L. B., Kochhar, S., van Bladeren P., Holmes, E., Nicholson, J. K. (2007) A top-down systems biology view of microbiome-mammalian metabolic interactions in a mouse model. *Mol.Syst.Biol.* 3:112.
- Martin, G. G., Atshaves, B. P., McIntosh, A. L., Mackie, J. T., Kier, A. B., Schroeder, F. (2005) Liver fatty-acid-binding protein (L-FABP) gene ablation alters liver bile acid metabolism in male mice. *Biochem.J.* 391:549-560.
- McConnell, E. L., Basit, A. W., Murdan, S. (2008) Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *J.Pharm.Pharmacol.* 60:63-70.
- Meier, P. J. (1995) Molecular mechanisms of hepatic bile salt transport from sinusoidal blood into bile. *Am.J.Physiol* 269:G801-G812.
- Mennone, A., Soroka, C. J., Harry, K. M., Boyer, J. L. (2010) Role of breast cancer resistance protein in the adaptive response to cholestasis. *Drug Metab Dispos* 38:1673-1678.
- Mihalik, S. J., Steinberg, S. J., Pei, Z., Park, J., Kim, D. G., Heinzer, A. K., Dacremont, G., Wanders, R. J., Cuebas, D. A., Smith, K. D., Watkins, P. A. (2002) Participation of two members of the very long-chain acyl-CoA synthetase family in bile acid synthesis and recycling. *J.Biol.Chem.* 277:24771-24779.
- Miyata, M., Matsuda, Y., Nomoto, M., Takamatsu, Y., Sato, N., Hamatsu, M., Dawson, P. A., Gonzalez, F. J., Yamazoe, Y. (2009) Cholesterol feeding prevents hepatic accumulation of bile acids in cholic acid-fed farnesoid X receptor (FXR)-null mice: FXR-independent suppression of intestinal bile acid absorption. *Drug Metab Dispos.* 37:338-344.
- Miyata, M., Tozawa, A., Otsuka, H., Nakamura, T., Nagata, K., Gonzalez, F. J., Yamazoe, Y. (2005) Role of farnesoid X receptor in the enhancement of canalicular bile acid output and excretion of unconjugated bile acids: a mechanism for protection against cholic acid-induced liver toxicity. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 312:759-766.
- Monte, M. J., Marin, J. J., Antelo, A., Vazquez-Tato, J. (2009) Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J.Gastroenterol.* 15:804-816.
- Moschetta, A., Xu, F., Hagey, L. R., van Berge-Henegouwen, G. P., van Erpecum, K. J., Brouwers, J. F., Cohen, J. C., Bierman, M., Hobbs, H. H., Steinbach, J. H., Hofmann, A. F. (2005) A phylogenetic survey of biliary lipids in vertebrates. *J.Lipid Res.* 46:2221-2232.
- Mukhopadhyay, S., Ananthanarayanan, M., Stieger, B., Meier, P. J., Suchy, F. J., Anwer, M. S. (1997) cAMP increases liver Na⁺-taurocholate cotransport by translocating transporter to plasma membranes. *Am.J.Physiol* 273:G842-G848.

- Nakai, K., und Kanehisa, M. (1992) A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* 14:897-911.
- Narushima, S., Itoh, K., Kuruma, K., Uchida, K. (1999a) Caecal bile acid compositions in gnotobiotic mice associated with human intestinal bacteria with the ability to transform bile acids in vitro. *Microb Ecol Health Dis* 11:55-60.
- Narushima, S., Itoh, K., Takamine, F., Uchida, K. (1999b) Absence of cecal secondary bile acids in gnotobiotic mice associated with two human intestinal bacteria with the ability to dehydroxylate bile acids in vitro. *Microbiol.Immunol.* 43:893-897.
- Narushima, S., Itoha, K., Miyamoto, Y., Park, S. H., Nagata, K., Kuruma, K., Uchida, K. (2006) Deoxycholic acid formation in gnotobiotic mice associated with human intestinal bacteria. *Lipids* 41:835-843.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10:1-6.
- O'Maille, E. R., und Richards, T. G. (1977) Possible explanations for the differences in secretory characteristics between conjugated and free bile acids. *J.Physiol* 265:855-866.
- Oude Elferink, R. P., Ottenhoff, R., van Wijland M., Smit, J. J., Schinkel, A. H., Groen, A. K. (1995) Regulation of biliary lipid secretion by *mdr2* P-glycoprotein in the mouse. *J.Clin.Invest* 95:31-38.
- Parks, D. J., Blanchard, S. G., Bledsoe, R. K., Chandra, G., Consler, T. G., Kliewer, S. A., Stimmel, J. B., Willson, T. M., Zavacki, A. M., Moore, D. D., Lehmann, J. M. (1999) Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 284:1365-1368.
- Pawlikowska, L., Groen, A., Eppens, E. F., Kunne, C., Ottenhoff, R., Looije, N., Knisely, A. S., Killeen, N. P., Bull, L. N., Elferink, R. P., Freimer, N. B. (2004) A mouse genetic model for familial cholestasis caused by *ATP8B1* mutations reveals perturbed bile salt homeostasis but no impairment in bile secretion. *Hum.Mol.Genet.* 13:881-892.
- Peet, D. J., Turley, S. D., Ma, W., Janowski, B. A., Lobaccaro, J. M., Hammer, R. E., Mangelsdorf, D. J. (1998) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93:693-704.
- Pellicoro, A. (2008) Hepatic peroxisome function in health and disease. Dissertation: Fachbereich Medische Wetenschappen der Rijksuniversiteit Groningen. <http://dissertations.ub.rug.nl/faculties/medicine/2008/a.pellicoro/>.
- Pellicoro, A., und Faber, K. N. (2007) Review article: The function and regulation of proteins involved in bile salt biosynthesis and transport. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 26 Suppl 2:149-160.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne G., Nielsen, H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat.Methods* 8:785-786.
- Pircher, P. C., Kitto, J. L., Petrowski, M. L., Tangirala, R. K., Bischoff, E. D., Schulman, I. G., Westin, S. K. (2003) Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation. *J.Biol.Chem.* 278:27703-27711.
- Posa, M. (2014) Human indices of hydrophobicity of bile acids and their comparison with a newly developed and conventional molecular descriptors. *Biochimie* 97:28-38.
- Praslickova, D., Torchia, E. C., Sugiyama, M. G., Magrane, E. J., Zwicker, B. L., Kolodzieyski, L., Agellon, L. B. (2012) The ileal lipid binding protein is required for efficient absorption and transport of bile acids in the distal portion of the murine small intestine. *PLoS.One.* 7:e50810.

- Rakhshandehroo, M., Knoch, B., Muller, M., Kersten, S. (2010) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR.Res.* 2010:612089.
- Rao, A., Haywood, J., Craddock, A. L., Belinsky, M. G., Kruh, G. D., Dawson, P. A. (2008) The organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is essential for intestinal bile acid transport and homeostasis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105:3891-3896.
- Rembacz, K. P., Woudenberg, J., Hoekstra, M., Jonkers, E. Z., van den Heuvel, F. A., Buist-Homan, M., Woudenberg-Vrenken, T. E., Rohacova, J., Marin, M. L., Miranda, M. A., Moshage, H., Stellaard, F., Faber, K. N. (2010) Unconjugated bile salts shuttle through hepatocyte peroxisomes for taurine conjugation. *Hepatology* 52:2167-2176.
- Repa, J. J., Berge, K. E., Pomajzl, C., Richardson, J. A., Hobbs, H., Mangelsdorf, D. J. (2002) Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J.Biol.Chem.* 277:18793-18800.
- Ridlon, J. M., Kang, D. J., Hylemon, P. B. (2006) Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J.Lipid Res.* 47:241-259.
- Roda, A., Minutello, A., Angellotti, M. A., Fini, A. (1990) Bile acid structure-activity relationship: evaluation of bile acid lipophilicity using 1-octanol/water partition coefficient and reverse phase HPLC. *J.Lipid Res.* 31:1433-1443.
- Rost, D., Herrmann, T., Sauer, P., Schmidts, H. L., Stieger, B., Meier, P. J., Stremmel, W., Stiehl, A. (2003) Regulation of rat organic anion transporters in bile salt-induced cholestatic hepatitis: effect of ursodeoxycholate. *Hepatology* 38:187-195.
- Russel, W. M. S., and Burch, R. L. (1959) *The Principles of Humane Experimental Technique.* Methuen & Co. Ltd, London: 238 ff.
- Russell, D. W. (2003) The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu.Rev.Biochem.* 72:137-174.
- Russell, D. W., und Setchell, K. D. (1992) Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* 31:4737-4749.
- Schaedler, R. W., Dubos, R., Costello, R. (1965) The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice. *J.Exp.Med.* 122:59-66.
- Scheifele, D., Bjornson, G., Dimmick, J. (1987) Rapid postmortem gut autolysis in infant rats: a potential problem for investigators. *Can.J.Vet.Res.* 51:404-406.
- Schiff, E. R., Small, N. C., Dietschy, J. M. (1972) Characterization of the kinetics of the passive and active transport mechanisms for bile acid absorption in the small intestine and colon of the rat. *J.Clin.Invest* 51:1351-1362.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., Ragg, T. (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC.Mol.Biol.* 7:3.
- Schumacher, S. (2011) Untersuchungen zur zonalen Verteilung der Transporter für Gallensalze und organische Anionen bei experimenteller Cholestase in der Rattenleber. Dissertation: Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2011/8070/>.
- Seol, W., Choi, H. S., Moore, D. D. (1995) Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol.Endocrinol.* 9:72-85.

- Setchell, K. D., Heubi, J. E., Shah, S., Lavine, J. E., Suskind, D., Al-Edreesi, M., Potter, C., Russell, D. W., O'Connell, N. C., Wolfe, B., Jha, P., Zhang, W., Bove, K. E., Knisely, A. S., Hofmann, A. F., Rosenthal, P., Bull, L. N. (2013) Genetic defects in bile acid conjugation cause fat-soluble vitamin deficiency. *Gastroenterology* 144:945-955.
- Shi, G., Zhang, Z., Feng, D., Xu, Y., Lu, Y., Wang, J., Jiang, J., Zhang, Z., Li, X., Ning, G. (2010) Selection of reference genes for quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction in concanavalin A-induced hepatitis model. *Anal.Biochem.* 401:81-90.
- Slijepcevic, D., Kaufman, C., Wichers, C. G., Gilgioni, E. H., Lempp, F. A., Duijst, S., de Waart, D. R., Oude Elferink, R. P., Mier, W., Stieger, B., Beuers, U., Urban, S., van de Graaf, S. F. (2015) Impaired uptake of conjugated bile acids and Hepatitis B Virus preS1-binding in Na-taurocholate cotransporting polypeptide knockout mice. *Hepatology* 2015 Jan 10. doi: 10.1002/hep.27694.
- Slitt, A. L., Allen, K., Morrone, J., Aleksunes, L. M., Chen, C., Maher, J. M., Manautou, J. E., Cherrington, N. J., Klaassen, C. D. (2007) Regulation of transporter expression in mouse liver, kidney, and intestine during extrahepatic cholestasis. *Biochim.Biophys.Acta* 1768:637-647.
- Smit, J. J., Schinkel, A. H., Oude Elferink, R. P., Groen, A. K., Wagenaar, E., van Deemter L., Mol, C. A., Ottenhoff, R., van der Lugt, N. M., van Roon, M. A. (1993) Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 75:451-462.
- Solaas, K., Kase, B. F., Pham, V., Bamberg, K., Hunt, M. C., Alexson, S. E. (2004) Differential regulation of cytosolic and peroxisomal bile acid amidation by PPAR alpha activation favors the formation of unconjugated bile acids. *J.Lipid Res.* 45:1051-1060.
- Solaas, K., Ulvestad, A., Soreide, O., Kase, B. F. (2000) Subcellular organization of bile acid amidation in human liver: a key issue in regulating the biosynthesis of bile salts. *J.Lipid Res.* 41:1154-1162.
- Song, P., Rockwell, C. E., Cui, J. Y., Klaassen, C. D. (2015) Individual bile acids have differential effects on bile acid signaling in mice. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 283:57-64.
- Song, P., Zhang, Y., Klaassen, C. D. (2011) Dose-response of five bile acids on serum and liver bile acid concentrations and hepatotoxicity in mice. *Toxicol.Sci.* 123:359-367.
- Stahl, A. (2004) A current review of fatty acid transport proteins (SLC27). *Pflugers Arch.* 447:722-727.
- Steinberg, S. J., Mihalik, S. J., Kim, D. G., Cuebas, D. A., Watkins, P. A. (2000) The human liver-specific homolog of very long-chain acyl-CoA synthetase is cholate:CoA ligase. *J.Biol.Chem.* 275:15605-15608.
- Stenman, L. K., Holma, R., Eggert, A., Korpela, R. (2013a) A novel mechanism for gut barrier dysfunction by dietary fat: epithelial disruption by hydrophobic bile acids. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 304:G227-G234.
- Stenman, L. K., Holma, R., Forsgard, R., Gylling, H., Korpela, R. (2013b) Higher fecal bile acid hydrophobicity is associated with exacerbation of dextran sodium sulfate colitis in mice. *J.Nutr.* 143:1691-1697.
- Stenman, L. K., Holma, R., Korpela, R. (2012) High-fat-induced intestinal permeability dysfunction associated with altered fecal bile acids. *World J.Gastroenterol.* 18:923-929.

- Stroeve, J. H., Brufau, G., Stellaard, F., Gonzalez, F. J., Staels, B., Kuipers, F. (2010) Intestinal FXR-mediated FGF15 production contributes to diurnal control of hepatic bile acid synthesis in mice. *Lab Invest* 90:1457-1467.
- Styles, N. A., Falany, J. L., Barnes, S., Falany, C. N. (2007) Quantification and regulation of the subcellular distribution of bile acid coenzyme A:amino acid N-acyltransferase activity in rat liver. *J.Lipid Res.* 48:1305-1315.
- Suchy, F. J., Balistreri, W. F., Hung, J., Miller, P., Garfield, S. A. (1983) Intracellular bile acid transport in rat liver as visualized by electron microscope autoradiography using a bile acid analogue. *Am.J.Physiol* 245:G681-G689.
- Sun, Y., Fihn, B. M., Jodal, M., Sjovall, H. (2004) Inhibition of nitric oxide synthesis potentiates the colonic permeability increase triggered by luminal bile acids. *Acta Physiol Scand.* 180:167-175.
- Sutherland, J. D., und Macdonald, I. A. (1982) The metabolism of primary, 7-oxo, and 7 beta-hydroxy bile acids by *Clostridium absonum*. *J.Lipid Res.* 23:726-732.
- Takikawa, H., Sugiyama, Y., Fernandez-Checa, J. C., Kuhlenkamp, J., Ookhtens, M., Kaplowitz, N. (1996) Evidence that interference with binding to hepatic cytosol binders can inhibit bile acid excretion in rats. *Hepatology* 23:1642-1649.
- The human protein atlas
<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000253598-SLC10A5/tissue> (Stand: 11.04.2015)
- Thomas, C., Pellicciari, R., Pruzanski, M., Auwerx, J., Schoonjans, K. (2008) Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat.Rev.Drug Discov.* 7:678-693.
- Tint, G. S., Salen, G., Colalillo, A., Graber, D., Verga, D., Speck, J., Shefer, S. (1982) Ursodeoxycholic acid: a safe and effective agent for dissolving cholesterol gallstones. *Ann.Intern.Med.* 97:351-356.
- Torchia, E. C., Cheema, S. K., Agellon, L. B. (1996) Coordinate regulation of bile acid biosynthetic and recovery pathways. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 225:128-133.
- Trauner, M., Claudel, T., Fickert, P., Moustafa, T., Wagner, M. (2010) Bile acids as regulators of hepatic lipid and glucose metabolism. *Dig.Dis.* 28:220-224.
- Tremaroli, V., und Bäckhed, F. (2012) Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489:242-249.
- Trottier, J., Milkiewicz, P., Kaeding, J., Verreault, M., Barbier, O. (2006) Coordinate regulation of hepatic bile acid oxidation and conjugation by nuclear receptors. *Mol.Pharm.* 3:212-222.
- Truett, G. E., Heeger, P., Mynatt, R. L., Truett, A. A., Walker, J. A., Warman, M. L. (2000) Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and Tris (HotSHOT). *Biotechniques* 29:52, 54.
- Uchida, K., Takase, H., Nomura, Y., Takeda, K., Takeuchi, N., Ishikawa, Y. (1984) Changes in biliary and fecal bile acids in mice after treatments with diosgenin and beta-sitosterol. *J.Lipid Res.* 25:236-245.

- Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjostedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C. A., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P. H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J. M., Hamsten, M., von Feilitzen K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., von Heijne G., Nielsen, J., Ponten, F. (2015) Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347:1260419.
- Une, M., Iguchi, Y., Sakamoto, T., Tomita, T., Suzuki, Y., Morita, M., Imanaka, T. (2003) ATP-dependent transport of bile acid intermediates across rat liver peroxisomal membranes. *J.Biochem.* 134:225-230.
- Vaz, F. M., Paulusma, C. C., Huidekoper, H., de Ru M., Lim, C., Koster, J., Ho-Mok, K., Bootsma, A. H., Groen, A. K., Schaap, F. G., Oude Elferink, R. P., Waterham, H. R., Wanders, R. J. (2015) Sodium taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) deficiency: conjugated hypercholanemia without a clear clinical phenotype. *Hepatology* 61:260-267.
- Venneman, N. G., und van Erpecum, K. J. (2010) Pathogenesis of gallstones. *Gastroenterol.Clin.North Am.* 39:171-183.
- Visser, W. F., van Roermund, C. W., Ijlst, L., Waterham, H. R., Wanders, R. J. (2007) Demonstration of bile acid transport across the mammalian peroxisomal membrane. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 357:335-340.
- Wain, H. M., Bruford, E. A., Lovering, R. C., Lush, M. J., Wright, M. W., Povey, S. (2002) Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics* 79:464-470.
- Wang, D. Q., und Tazuma, S. (2002) Effect of beta-muricholic acid on the prevention and dissolution of cholesterol gallstones in C57L/J mice. *J.Lipid Res.* 43:1960-1968.
- Wang, D. Q., Tazuma, S., Cohen, D. E., Carey, M. C. (2003a) Feeding natural hydrophilic bile acids inhibits intestinal cholesterol absorption: studies in the gallstone-susceptible mouse. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 285:G494-G502.
- Wang, F., Wang, J., Liu, D., Su, Y. (2010) Normalizing genes for real-time polymerase chain reaction in epithelial and nonepithelial cells of mouse small intestine. *Anal.Biochem.* 399:211-217.
- Wang, R., Lam, P., Liu, L., Forrest, D., Yousef, I. M., Mignault, D., Phillips, M. J., Ling, V. (2003b) Severe cholestasis induced by cholic acid feeding in knockout mice of sister of P-glycoprotein. *Hepatology* 38:1489-1499.
- Warskulat, U., Borsch, E., Reinehr, R., Heller-Stilb, B., Monnighoff, I., Buchczyk, D., Donner, M., Flögel, U., Kappert, G., Soboll, S., Beer, S., Pfeffer, K., Marschall, H. U., Gabrielsen, M., Amiry-Moghaddam, M., Ottersen, O. P., Dienes, H. P., Haussinger, D. (2006) Chronic liver disease is triggered by taurine transporter knockout in the mouse. *FASEB J.* 20:574-576.
- Watanabe, M., Houten, S. M., Matak, C., Christoffolete, M. A., Kim, B. W., Sato, H., Messaddeq, N., Harney, J. W., Ezaki, O., Kodama, T., Schoonjans, K., Bianco, A. C., Auwerx, J. (2006) Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 439:484-489.
- Westin, M. A., Alexson, S. E., Hunt, M. C. (2004) Molecular cloning and characterization of two mouse peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)-regulated peroxisomal acyl-CoA thioesterases. *J.Biol.Chem.* 279:21841-21848.

- Wieckowski, M. R., Giorgi, C., Lebiezinska, M., Duszynski, J., Pinton, P. (2009) Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat.Protoc.* 4:1582-1590.
- Wilson, M. (2005) *Microbial inhabitants of humans*. Cambridge Univ. Press 1-47, 251-313, 375-392.
- Wilton, J. C., Matthews, G. M., Burgoyne, R. D., Mills, C. O., Chipman, J. K., Coleman, R. (1994) Fluorescent choleretic and cholestatic bile salts take different paths across the hepatocyte: transcytosis of glycolithocholate leads to an extensive redistribution of annexin II. *J.Cell Biol.* 127:401-410.
- Wishart, D. S., Jewison, T., Guo, A. C., Wilson, M., Knox, C., Liu, Y., Djoumbou, Y., Mandal, R., Aziat, F., Dong, E., Bouatra, S., Sinelnikov, I., Arndt, D., Xia, J., Liu, P., Yallou, F., Bjorn Dahl, T., Perez-Pineiro, R., Eisner, R., Allen, F., Neveu, V., Greiner, R., Scalbert, A. (2013) HMDB 3.0 – The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res.* 41:D801-D807.
- Wolfer, D. P., Crusio, W. E., Lipp, H. P. (2002) Knockout mice: simple solutions to the problems of genetic background and flanking genes. *Trends Neurosci.* 25:336-340.
- Wong, M. H., Oelkers, P., Craddock, A. L., Dawson, P. A. (1994) Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J.Biol.Chem.* 269:1340-1347.
- Wong, M. H., Oelkers, P., Dawson, P. A. (1995) Identification of a mutation in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene that abolishes transport activity. *J.Biol.Chem.* 270:27228-27234.
- Xu, G., Pan, L. X., Li, H., Forman, B. M., Erickson, S. K., Shefer, S., Bollineni, J., Batta, A. K., Christie, J., Wang, T. H., Michel, J., Yang, S., Tsai, R., Lai, L., Shimada, K., Tint, G. S., Salen, G. (2002) Regulation of the farnesoid X receptor (FXR) by bile acid flux in rabbits. *J.Biol.Chem.* 277:50491-50496.
- Yamamuro, W., Stolz, A., Takikawa, H., Sugimoto, M., Kaplowitz, N. (1994) Distribution of 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (bile acid binder) in rat small intestine: comparison with glutathione S-transferase subunits. *J.Gastroenterol.* 29:115-119.
- Yeh, T. H., Krauland, L., Singh, V., Zou, B., Devaraj, P., Stolz, D. B., Franks, J., Monga, S. P., Sasatomi, E., Behari, J. (2010) Liver-specific beta-catenin knockout mice have bile canalicular abnormalities, bile secretory defect, and intrahepatic cholestasis. *Hepatology* 52:1410-1419.
- Yu, C. S., Chen, Y. C., Lu, C. H., Hwang, J. K. (2006) Prediction of protein subcellular localization. *Proteins* 64:643-651.
- Yu, L., Gupta, S., Xu, F., Liverman, A. D., Moschetta, A., Mangelsdorf, D. J., Repa, J. J., Hobbs, H. H., Cohen, J. C. (2005) Expression of ABCG5 and ABCG8 is required for regulation of biliary cholesterol secretion. *J.Biol.Chem.* 280:8742-8747.
- Zhang, Y. (2011) Characterization of organic anion transporting polypeptide 1a1 (Oatp1a1) in the bile acid homeostasis of mice. Dissertation: Department of Pharmacology, Toxicology and Therapeutics, University of Kansas Medical Center.
http://kuscholarworks.ku.edu/bitstream/handle/1808/7930/Zhang_ku_0099D_11412_DATA_1.pdf?sequence=1
- Zhang, Y., Hong, J. Y., Rockwell, C. E., Copple, B. L., Jaeschke, H., Klaassen, C. D. (2012) Effect of bile duct ligation on bile acid composition in mouse serum and liver. *Liver Int.* 32:58-69.

- Zhang, Y., Kast-Woelbern, H. R., Edwards, P. A. (2003) Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation. *J.Biol.Chem.* 278:104-110.
- Zhang, Y., und Klaassen, C. D. (2010) Effects of feeding bile acids and a bile acid sequestrant on hepatic bile acid composition in mice. *J.Lipid Res.* 51:3230-3242.
- Zhang, Y. K., Guo, G. L., Klaassen, C. D. (2011) Diurnal variations of mouse plasma and hepatic bile acid concentrations as well as expression of biosynthetic enzymes and transporters. *PLoS.One.* 6:e16683.
- Zollner, G., Fickert, P., Fuchsbichler, A., Silbert, D., Wagner, M., Arbeiter, S., Gonzalez, F. J., Marschall, H. U., Zatloukal, K., Denk, H., Trauner, M. (2003) Role of nuclear bile acid receptor, FXR, in adaptive ABC transporter regulation by cholic and ursodeoxycholic acid in mouse liver, kidney and intestine. *J.Hepatol.* 39:480-488.
- Zollner, G., Marschall, H. U., Wagner, M., Trauner, M. (2006a) Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: pathogenetic and therapeutic considerations. *Mol.Pharm.* 3:231-251.
- Zollner, G., Wagner, M., Moustafa, T., Fickert, P., Silbert, D., Gumhold, J., Fuchsbichler, A., Halilbasic, E., Denk, H., Marschall, H. U., Trauner, M. (2006b) Coordinated induction of bile acid detoxification and alternative elimination in mice: role of FXR-regulated organic solute transporter-alpha/beta in the adaptive response to bile acids. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 290:G923-G932.
- Zwicker, B. L., und Agellon, L. B. (2013) Transport and biological activities of bile acids. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 45:1389-1398.

9 Anhang

Tab. 9.1 Statistische Auswertung der Gallensäurekonzentrationen in der Galle

Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller Anova und den Faktoren Fütterung und Genotyp. Der Vergleich von *Slc10a5*-Knockout- und Wildtyp-Maus bei Kontroll- (K) und 0,5 % Cholsäurefütterung (C) wurde mit dem Bonferroni-Post-Test durchgeführt.

Gruppengröße: n = 4 (ko Kontrolle, ko Cholsäure, wt Kontrolle), n = 5 (wt Cholsäure)

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; n. s. nicht signifikant = p > 0,05; n. d. nicht detektierbar

Gallensäure	Interaktion	Fütterung	Genotyp	Post-test (K/C)
C	***	***	***	n. s./***
α/ω-MC	***	***	***	n. s./***
β-MC	***	**	**	n. s./***
CDC	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
DC	n. s.	***	n. s.	n. s.
UDC	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
HDC	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
LC	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
LCS	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
7-oxo-DC	***	***	***	n. s./***
TC	*	***	n. s.	n. s.
TMC	n. s.	***	n. s.	n. s.
TCDC		***	n. s.	n. s.
TDC	***	***	***	***
TUDC	n. s.	***	n. s.	n. s.
THDC	n. s.	***	n. s.	n. s.
TLC	n. s.	**	n. s.	n. s.
T-7oxo-DC	*	***	n. s.	n. s.
GC	*	**	*	n. s./*
GMC	n. s.	***	n. s.	n. s.
GCDC	n. s.	*	n. s.	n. s.
GDC	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
GUDC	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
GHDC	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
GLC	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.

Tab. 9.2 Statistische Auswertung der Gallensäurekonzentrationen im Plasma

Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweifaktorieller Anova und den Faktoren Fütterung und Genotyp. Der Vergleich von *Slc10a5*-Knockout- und Wildtyp-Maus bei Kontroll- (K) und 0,5 % Cholsäurefütterung (C) wurde mit dem Bonferroni-Post-Test durchgeführt.

Gruppengröße: n = 4 (ko Kontrolle und wt Kontrolle), n = 5 (wt Cholsäure) und n = 3 (ko Cholsäure)

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; n. s. nicht signifikant = p > 0,05; n. d. nicht detektierbar

Gallensäure	Interaktion	Fütterung	Genotyp	Post-test (K/C)
C	n. s.	*	n. s.	n. s.
α/ω-MC	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
β-MC	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
CDC	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
DC	n. s.	*	n. s.	n. s.
UDC	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
HDC	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
LC	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
LCS	***	***	***	***/n. s.
7-oxo-DC	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
TC	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
TMC	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
TCDC	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
TDC	*	*	*	n. s./**
TUDC	n	n	n. s.	n. s.
THDC	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
TLC	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
T-7oxo-DC	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
GC	n. s.	**	n. s.	n. s.
GMC	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
GCDC	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
GDC	**	***	**	n. s./***
GUDC	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
GHDC	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
GLC	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.

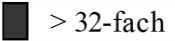
Tab. 9.3 Bezeichnungen der Proteine und der korrespondierenden Gene

Aufzählung der in der Arbeit behandelten Proteine bei Mensch und Maus mit ihren entsprechenden codierenden Genen.

Proteinname	Alias	Genname	Alias
ACNAT2		<i>Acnat2</i>	
ACOT8	PTE2	<i>Acot8</i>	
ASBT		<i>SLC10A2/Slc10a2</i>	
BAAT		<i>BAAT/Baat</i>	
BCRP		<i>ABCG2/Abcg2</i>	
BSEP		<i>ABCB11/Abcb11</i>	
CAR		<i>CAR/Car</i>	<i>NR1I3/Nr1i3</i>
CSAD	CSD	<i>CSAD/Csad</i>	
CYP27A1		<i>CYP27A1/Cyp27a1</i>	
CYP27A1		<i>CYP27A1/Cyp27a1</i>	
CYP7A1		<i>CYP7A1/Cyp7a1</i>	
CYP7B1		<i>CYP7B1/Cyp7B1</i>	
CYP8B1		<i>CYP8B1/Cyp8b1</i>	
FABP1		<i>FABP1/Fabp1</i>	
FABP6	iBAPB, ILBP	<i>FABP6/Fabp6</i>	
FATP2	VLCS	<i>SLC27A2/Slc27a2</i>	
FATP5	BACS, VLCS-H2	<i>SLC27A5/Slc27a5</i>	
FGF15		<i>Fgf15</i>	
FGF19		<i>FGF19</i>	
FGFR4	CD334	<i>FGFR4/Fgfr4</i>	
FXR		<i>NR1H4/Nr1h4</i>	
GAPDH		<i>GAPDH/Gapdh</i>	
HNF4 α		<i>NR2A1/Nr2a1</i>	
HPRT		<i>HPRT/Hprt</i>	
LHR1		<i>LHR1/Lhr1</i>	<i>NR5A2/Nr5a2</i>
LXR α		<i>LXRα/Lxrα</i>	<i>NR1I2/Nr1i2</i>
MDR2		<i>Abcb4</i>	
MDR3		<i>ABCB4</i>	
MRP2		<i>ABCC2/Abcc2</i>	
MRP3		<i>ABCC3/Abcc3</i>	
MRP4		<i>ABCC4/Abcc4</i>	
NTCP		<i>SLC10A1/Slc10a1</i>	
OATP1A1	OATP-1	<i>Slco1a1</i>	<i>Slc21a1</i>
OATP1A4	OATP-2	<i>Slco1a4</i>	<i>Slc21a5</i>
OATP1B1	OATP-C, OATP2, LST-1	<i>SLCO1B1</i>	<i>SLC21A6</i>
Oatp1b2	OATP-C, OATP4, Lst-1	<i>Slco1b2</i>	<i>Slc21a6, Slc21a10</i>
OATP1B3	OATP-8, LST-2	<i>SLCO1B3</i>	<i>SLC21A8</i>
OST α		<i>OSTα/Osta</i>	<i>SLC51A/Slc51a</i>
OST β		<i>OSTβ/Ostβ</i>	<i>SLC51B/Slc51b</i>
PPAR α		<i>PPARα/Ppara</i>	<i>NR1C1/Nr1c1</i>
PXR		<i>PXR/Pxr</i>	<i>NR1I2/Nr1i2</i>
RXR		<i>RXR/Rxr</i>	
SHP		<i>SHP/Shp</i>	<i>NR0B2/Nr0b2</i>
SOAT		<i>SLC10A6/Slc10a6</i>	
TAUT		<i>SLC6A6/Slc6a6</i>	
VDR		<i>VDR/Vdr</i>	<i>NR1I1/Nr1i1</i>

Tab. 9.4 Hochregulierte Gene der *Slc10a5*-Knockout-Maus – Cholsäurefütterung/Kontrolle

Zur Untersuchung des Einflusses der 0,5 % Cholsäurefütterung auf die Genexpression der *Slc10a5*-Knockout-Mäuse wurde aus den normalisierten Arraydaten mittels eines Excelmakros auf die Gene gefiltert, die konsistent eine Regulierung von mindestens Faktor 2 aufweisen. Als Schwellenwert der Intensität wurde 50 und als Surrogatwert 15 definiert, und kaum charakterisierte Gene wurden ausgeschlossen. Alle möglichen Quotienten aus mit Cholsäure gefütterten und kontrollgefütterten Knockout-Mäusen wurden gebildet und mit einbezogen.

Regulation  > 32-fach 8-32-fach 2-8-fach 0-2-fach

Gen Name	Gen Nummer		Gen Name	Gen Nummer	
Abcb1a	NM_011076		Cyp2b13	NM_007813	
Abcb1b	NM_011075		Cyp2c38	NM_010002	
Abcb4	AK165484		Cyp2c55	NM_028089	
Abcd2	NM_011994		Cyp39a1	NM_018887	
Abcg5	NM_031884		Cyp3a44	NM_177380	
Abcg8	NM_026180		Cyp3a57	NM_001100180	
Acot3	NM_134246		Cyp3a59	NM_001105160	
Acot5	NM_145444		Cyp4a14	NM_007822	
Acot9	NM_019736		Dbf4	NM_013726	
Adamts7	NM_001003911		Dcaf6	NM_028759	
Ak4	NM_001177602		Ddah1	NM_026993	
Akr1b3	NM_009658		Ddit4l	NM_030143	
Akr1b7	NM_009731		Ddr1	NM_007584	
Alcam	NM_009655		Defb1	NM_007843	
Ankrd13b	NM_172945		Degs2	NM_027299	
Arhgap11a	NM_181416		Dil1	NM_007865	
Arhgap17	NM_144529		Dil4	NM_019454	
Arhgap18	NM_176837		Dnase1l2	NM_025718	
Arhgap22	NM_153800		Dsn1	NM_025853	
Arhgef38	ENSMUST00000054105		Dyrk3	NM_145508	
Arl9	NM_206935		Elovl7	NM_029001	
Atp8b5	NM_177195		Epas1	NM_010137	
B4galt5	NM_019835		Epb4.1l5	NM_145506	
Bcl2a1c	NM_007535		Esco2	NM_028039	
Bcl2l15	NM_001142959		Fam110a	NM_028666	
Bcl7c	AK038789		Fam211a	NM_198861	
Bex2	NM_009749		Fam46a	NM_001160378	
Birc5	NM_009689		Fam72a	NM_175382	
Brip1	NM_178309		Fanca	NM_016925	
Btg3	NM_009770		Fgfr2	NM_010207	
Camk2d	AK142435		Figf	NM_010216	
Camk2n2	NM_028420		Fkbp5	NM_010220	
Cbr1	NM_007620		Fmo2	NM_018881	
Cbr3	NM_173047		Fmo3	NM_008030	
Ccdc107	ENSMUST00000107922		Foxm1	NM_008021	
Ccdc120	NM_207202		Fry	NM_172887	
Ccnb1	NM_172301		Gcnt2	NM_008105	
Ccnb2	NM_007630		Git2	NM_019834	
Ccnd1	NM_007631		Gja1	NM_010288	
Ccsap	NM_028536		Gmnn	NM_020567	
Cd209a	NM_133238		Golm1	NM_027307	
Cdc25a	NM_007658		Gpr64	NM_178712	
Cdca5	NM_026410		Gpr65	NM_008152	
Cdca8	NM_026560		Gpx2	NM_030677	
Cdcp2	NM_172873		Gsta4	NM_010357	
Cdk1	NM_007659		Gstm1	NM_010358	
Cdkn1a	NM_007669		Gstm2	NM_008183	
Cdkn1c	NM_009876		Gstm3	NM_010359	
Cdkn3	NM_028222		Gstm4	NM_026764	
Cds2	BC059776		Gxylt1	NM_001033275	
Cenpi	NM_145924		H2bfbm	NM_027067	
Ces1a	NM_001013764		Havcr2	NM_134250	
Chpf	NM_001001565		Hells	NM_008234	
Chrdl2	NM_133709		Hmga1	NM_016660	
Ckap2	NM_001004140		Hsd17b13	NM_198030	
Cln6	NM_001033175		Hsd17b6	NM_013786	
Crebbp	NM_001025432		Ifi2712b	NM_145449	
Cux2	ENSMUST00000111752		lhh	NM_010544	
Cyhr1	AK129156		Il22ra1	NM_178257	





Anhang

Gen Name	Gen Nummer
Inhbb	NM_008381
lsyna1	NM_023627
Jam2	NM_023844
Kcnab1	NM_010597
Kctd11	NM_153143
Kctd2	NM_183285
Klf16	NM_078477
Knstm	NM_026412
Krt31	NM_010659
Krtcap3	NM_027221
Lass6	NM_172856
Lbp	NM_008489
Ldlrad4	NM_172631
Lhx6	NM_008500
Lor	NM_008508
Lpar2	NM_020028
Lpl	NM_008509
Lrrc51	NM_001162974
Map4k4	NM_001252200
Mapk8ip1	NM_001202445
Marco	NM_010766
Marveld1	AK081212
Megf9	NM_172694
Mettl20	NM_001252097
Mfsd7a	NM_172883
Mfsd7c	NM_145447
Mki67	NM_001081117
Mthfd1l	NM_172308
Mtmr11	NM_181409
N4bp2l1	AK035593
Nek2	NM_010892
Nipa1	NM_001081205
Nln	NM_029447
Nqo1	NM_008706
Nrg1	NM_178591
Nudt19	NM_033080
Oraov1	AK046447
Otud1	NM_027715
Otud3	NM_028453
Pafah1b3	NM_008776
Palb2	NM_001081238
Pbk	NM_023209
Pcsk5	NM_001190483
Pdp1	NM_001098230
Phf13	NM_172705
Pif1	NM_172453
Pir	NM_027153
Pitpnm1	NM_001136078
Pkmyt1	NM_023058
Pla2g7	NM_013737
Plscr1	NM_011636
Pnp2	NM_001123371
Pogk	NM_175170
Polk	NM_012048
Ppap2c	NM_015817
Ppl	NM_008909
Prc1	NM_145150
Prelid2	NM_029942
Prkx	NM_016979
Prom1	NM_001163577
Psrc1	NM_001190161
Rad51b	NM_009014
Rad54b	NM_001039556
Rbbp8	NM_001081223
Rdh9	NM_153133
Rhbdd2	NM_146002
Rnase4	NM_021472
Rnf145	NM_028862
Rsph1	NM_025290

Gen Name	Gen Nummer
Rundc3b	NM_198620
S100g	NM_009789
Sacs	ENSMUST00000119943
Scara3	NM_172604
Scarb1	NM_016741
Sct	NM_011328
Sema3b	NM_001042779
Serpine1	NM_008871
Sertad1	NM_018820
Sertad3	NM_133210
Setd3	ENSMUST00000147466
Setd4	NM_145482
Sh2d5	NM_001099631
Sh3yl1	NM_013709
Slc13a5	NM_001004148
Slc17a4	NM_177016
Slc22a26	NM_146232
Slc40a1	NM_016917
Slc51b	NM_178933
Slc5a3	NM_017391
Slc6a13	NM_144512
Slc6a8	NM_001142809
Slco1a4	NM_030687
Snx6	NM_026998
Sowahb	NM_175270
Spag1	NM_012031
Spc25	NM_001199123
Specc1	NM_001029936
Spg20	NM_144895
Spink3	NM_009258
Spopl	NM_001165997
Srd5a3	NM_020611
Stmn1	NM_019641
Sybu	NM_176998
Syce2	NM_027954
Tagln2	NM_178598
Tead1	NM_001166584
Task1	NM_011571
Thbd	NM_009378
Tigd5	NM_178646
Timp1	NM_001044384
Tm4sf4	NM_145539
Tmc7	NM_172476
Tmeff2	NM_019790
Tmem132b	NM_001190352
Tmem141	NM_001040130
Tmem198	NM_177056
Tmem229a	NM_177013
Tmem43	NM_028766
Tnfrsf10b	NM_020275
Tnfrsf12a	NM_013749
Tpm1	NM_001164248
Tpx2	NM_028109
Trp13	NM_027182
Trpm6	NM_153417
Ttc39a	NM_153392
Tuba8	NM_017379
Tubb6	NM_026473
Uap1l1	NM_001033293
Unc79	NM_001081017
Vasn	NM_139307
Vwa5b1	NM_029401
Whsc1	NM_001177884
Wnk4	NM_175638
Zbtb1	ENSMUST00000042779
Zbtb42	NM_001100460
Zdhhc2	ENSMUST00000049389
Zfp189	NM_145547
Zfp7	NM_145916

Tab. 9.5 Herabregulierte Gene der *Slc10a5*-Knockout-Maus – Cholsäurefütterung/Kontrolle

Zur Untersuchung des Einflusses der 0,5 % Cholsäurefütterung auf die Genexpression der *Slc10a5*-Knockout-Mäuse wurde aus den normalisierten Arraydaten mittels eines Excelmakros auf die Gene gefiltert, die konsistent eine Regulierung von mindestens Faktor 2 aufweisen. Als Schwellenwert der Intensität wurde 50 und als Surrogatwert 15 definiert, und kaum charakterisierte Gene wurden ausgeschlossen. Alle möglichen Quotienten aus mit Cholsäure gefütterten und kontrollgefütterten Knockout-Mäusen wurden gebildet und mit einbezogen.

Regulation  > 32-fach  8 - 32-fach  2 - 8-fach  0 - 2-fach

Gen Name	Gen Nummer	
Aacs	NM_030210	
Aadat	NM_011834	
Aatk	NM_007377	
Acacb	NM_133904	
Acat1	NM_144784	
Acly	NM_134037	
Acpp	NM_207668	
Acsi1	NM_007981	
Acsm1	NM_054094	
Acss2	NM_019811	
Adam2	NM_009618	
Adh6a	NM_026945	
Adtrp	NM_175417	
Agap2	NM_001033263	
Agmat	NM_001081408	
Alas2	NM_009653	
Aldh1a1	NM_013467	
Aldoc	NM_009657	
Als2cr12	NM_175370	
Ankrd33b	NM_027496	
Ankrd42	NM_028665	
Anks1b	AK036288	
Anp32a	NM_009672	
Apoc3	ENSMUST00000118649	
Aqp4	NM_009700	
Aqp8	NM_007474	
Arhgap26	NM_175164	
Asns	NM_012055	
Atg7	NM_001253717	
Atl2	NM_019717	
Atp12a	NM_138652	
B3galt1	NM_020283	
Bhmt	NM_016668	
Birc7	NM_001163247	
C2cd4d	NM_001136117	
C6	NM_016704	
C8a	NM_146148	
C8b	NM_133882	
Cad	NM_023525	
Car1	NM_009799	
Car3	NM_007606	
Ccdc151	NM_001163787	
Ccdc162	ENSMUST00000160002	
Ccdc30	NM_029286	
Ccdc66	NM_177111	
Cd6	NM_009852	
Cdk12	NM_026952	
Cebpa	NM_007678	
Cela1	NM_033612	
Cep110	NM_012018	
Ces1e	NM_133660	
Ces2b	NM_198171	
Ces2c	NM_145603	
Ces3a	NM_198672	
Ces3b	NM_001159415	
Ces4a	NM_146213	
Cir1	NM_025854	
Cldn2	NM_016675	
Clec2e	NM_153506	

Gen Name	Gen Nummer	
Clec2g	NM_027562	
Clstn2	NM_022319	
Clstn3	NM_153508	
Cmah	NM_001111110	
Cml2	NM_053096	
Cml5	NM_023493	
Cnksr2	ENSMUST00000112513	
Col27a1	NM_025685	
Cpsf4l	NM_001164532	
Cryaa	NM_013501	
Csad	NM_144942	
Cyb5b	NM_025558	
Cyb5rl	NM_175471	
Cyp21a1	NM_009995	
Cyp2c37	NM_010001	
Cyp2c50	NM_134144	
Cyp2c54	NM_206537	
Cyp2d34	NM_145474	
Cyp2d9	NM_010006	
Cyp2j5	NM_010007	
Cyp2u1	AK041477	
Cyp46a1	NM_010010	
Cyp4a12a	NM_177406	
Cyp4a12b	NM_172306	
Cyp4f14	NM_022434	
Cyp4f40	NM_001101588	
Cyp4v3	NM_133969	
Cyp51	NM_020010	
Cyp7a1	NM_007824	
Cyp7b1	NM_007825	
Cyp8b1	NM_010012	
D0H4S114	NM_053078	
Dct	NM_010024	
Ddc	NM_001190448	
Dhcr7	NM_007856	
Dio1	NM_007860	
Dis3l2	NM_001172157	
Dkk4	NM_145592	
Dnahc11	NM_010060	
Dnahc17	NM_001167746	
Dnase1	NM_010061	
Dnttip1	AK168315	
Dpy19l1	NM_172920	
Eaf2	NM_001113401	
Egfr	NM_207655	
Elac1	NM_053255	
Elov13	NM_007703	
Elp4	NM_023876	
Engase	NM_172573	
Enho	NM_027147	
Esrrg	NM_001243792	
Ethe1	NM_023154	
Extl1	NM_019578	
Fabp5	NM_001272097	
Fam222a	NM_001004180	
Fam228b	NM_175431	
Fam25c	NM_183278	
Fam26f	NM_175449	
Fam89a	NM_001081120	

Anhang

Gen Name	Gen Nummer	
Fbxw15	NM_199036	
Fdft1	NM_010191	
Fdps	NM_001253751	
Fdx1	NM_007996	
Fermt2	NM_146054	
Flt3	AK045865	
Fmn1	NM_010230	
Foxl2	NM_012020	
Fzd8	NM_008058	
G6pc	NM_008061	
Gamt	NM_010255	
Gapdhs	NM_008085	
Gbp1	NM_010259	
Gbp6	NM_194336	
Gcdh	NM_008097	
Ghr	NM_001048178	
Gjb2	NM_008125	
Glt25d2	NM_177756	
Gna14	NM_008137	
Gnat1	NM_008140	
Gngt1	NM_010314	
Gpr162	NM_013533	
Gpr180	NM_021434	
Gpr45	NM_053107	
Grb10	NM_010345	
Grh13	NM_001013756	
Grik5	NM_008168	
Grin3b	NM_130455	
Grip2	NM_001159507	
Gsto2	NM_026619	
Gstp1	NM_013541	
H2-Ob	NM_010389	
H3f3b	NM_008211	
Hes6	NM_019479	
Hlcs	NM_139145	
Hmgcr	NM_008255	
Hmgcs1	AK031297	
Hsd17b10	NM_016763	
Hsd17b7	NM_010476	
Hsd3b2	NM_153193	
Hsd3b5	NM_008295	
Hsd3b7	NM_133943	
Htra4	NM_001081187	
Hunk	NM_015755	
Ick	NM_019987	
Idi1	NM_145360	
Ido2	NM_145949	
Ildr1	NM_013562	
Il1rap	NM_134103	
Irf5	NM_012057	
Katnb1	NM_028805	
Kctd1	NM_001142731	
Keg1	NM_029550	
Kiss1	NM_178260	
Klf1	NM_010635	
Krt9	NM_201255	
Krtap5-2	NM_027844	
Krtap5-5	NM_001037822	
Lad1	NM_133664	
Lag3	NM_008479	
Lama3	NM_010680	
Lamb3	NM_008484	
Lgals8	NM_001199043	
Lhx3	NM_001039653	
Lhx9	NM_001042577	
Lipe	NM_010719	
Lipg	NM_010720	
Lipn	NM_027340	
Lrit1	NM_146245	
Lrp2	NM_001081088	
Lss	NM_146006	
Mab21l2	NM_011839	
Masp2	NM_001003893	
Matk	NM_010768	
Mcm10	NM_027290	

Gen Name	Gen Nummer	
Med1	NM_134027	
Mettl20	AK077292	
Mkx	NM_177595	
Mmab	NM_029956	
Mmd2	NM_175217	
Mogat1	NM_026713	
Morn3	NM_029112	
Mpst	NM_138670	
Mpv17l	NM_033564	
Mrgpre	NM_175534	
Msh4	NM_031870	
Msl3l2	NM_001163833	
Mterfd3	NM_028832	
Mup2	NM_001045550	
Mup21	NM_001009550	
Mup4	NM_008648	
Mup5	NM_008649	
Mup6	NM_001081285	
Mup9	NM_001126319	
Mvd	NM_138656	
Mvk	NM_023556	
Myc	NM_010849	
Myct1	NM_026793	
Nanog	NM_028016	
Nat8	NM_023455	
Ncmab	NM_001243306	
Nfe2	NM_008685	
Niacr1	NM_030701	
Nme4	NM_019731	
Nnmt	NM_010924	
Nsdhl	NM_010941	
Nudt7	NM_024437	
Nxpe2	NM_030069	
Oat	NM_016978	
Olf1r1148	NM_001011519	
Olf1r125	NM_146290	
Olf1r1307	NM_001011787	
Olf1r1384	NM_146472	
Olf1r1474	NM_001011842	
Olf1r151	NM_207664	
Olf1r1535	NM_207572	
Olf1r392	NM_147006	
Olf1r394	NM_147007	
Olf1r521	NM_146356	
Olf1r608	NM_146756	
Olf1r612	NM_001200027	
Olf1r677	NM_146358	
Olf1r681	NM_207557	
Olf1r746	NM_146298	
Olf1r965	NM_001011859	
Olig1	NM_016968	
Osbp2	NM_152818	
Paox	BC082783	
Paqr7	NM_027995	
Paqr9	NM_198414	
Pax2	NM_011037	
Pcdhb1	NM_053126	
Pcdhb12	NM_053137	
Pcdhgc5	NM_033583	
Pdilt	NM_027943	
Pfkfb1	NM_008824	
Pfn4	NM_028376	
Pglyrp2	NM_001271478	
Plod1	NM_011122	
Pmvk	NM_026784	
Ppp1r3g	NM_029628	
Ppp1r9a	NM_181595	
Prhoxnb	NM_001039678	
Prkcz	NM_008860	
Prok1	BC042707	
Proz	AK005011	
Prss44	ENSMUST00000141089	
Psg28	NM_054063	
Psmb9	NM_013585	
Ptk2b	NM_172498	





Anhang

Gen Name	Gen Nummer	
Pvrl2	NM_008990	
Qdpr	NM_024236	
Raet1c	NM_009018	
Rarres1	NM_001164763	
Rhbg	NM_021375	
Rhox2e	NM_001085348	
Ripply2	NM_001037907	
Rnf103	NM_009543	
Rnf125	NM_026301	
Rnf167	NM_027445	
Rtp3	NM_153100	
Sc4mol	NM_025436	
Sc5d	NM_172769	
Scnn1a	NM_011324	
Sdr9c7	NM_027301	
Selenbp1	NM_009150	
Sema5b	NM_013661	
Serpina12	NM_026535	
Serpina9	NM_027997	
Serpinb1a	NM_025429	
Serpinb1c	NM_173051	
Sgsm1	NM_172718	
Shank1	NM_001034115	
Siglech	ENSMUST00000171077	
Sirt5	NM_178848	
Slc10a1	NM_011387	
Slc13a2	NM_022411	
Slc13a4	NM_172892	
Slc16a2	NM_009197	
Slc16a6	NM_001029842	
Slc17a8	NM_182959	
Slc1a2	NM_001077514	
Slc22a16	NM_027572	
Slc22a28	NM_001013820	
Slc22a7	NM_144856	
Slc23a1	NM_011397	
Slc25a42	NM_001007570	
Slc26a1	NM_174870	
Slc2a5	NM_019741	
Slc30a7	NM_023214	
Slc38a3	NM_023805	
Slc43a1	NM_001081349	
Slc46a3	NM_027872	
Slc47a1	NM_026183	
Slco1a1	NM_013797	
Smo	NM_176996	
Snap47	NM_144521	
Sntg2	NM_172951	
Sohlh2	NM_028937	
Sp5	NM_022435	
Spns2	NM_153060	
Spsb1	NM_029035	

Gen Name	Gen Nummer	
Sqle	NM_009270	
Srebf2	NM_033218	
Srgap3	NM_080448	
Srrm2	NM_175229	
Ssbp3	NM_023672	
St6galnac1	NM_011371	
Stac2	NM_146028	
Sub1	NM_011294	
Sucnr1	NM_032400	
Sult5a1	NM_020564	
Susd4	NM_144796	
Synpo	AK020250	
Taf1b	NM_020614	
Tap1	NM_013683	
Tbc1d22b	NM_198647	
Tex26	NM_029464	
Tlcd2	NM_027249	
Tlr12	NM_205823	
Tlr5	NM_016928	
Tmc7	NM_172476	
Tmem14a	AK017734	
Tmem254a	NM_026679	
Tmem28	ENSMUST00000096363	
Tmprss9	NM_001081688	
Tnfsf10	NM_009425	
Trdmt1	NM_010067	
Trex2	NM_011907	
Trim7	NM_053166	
Tsc22d1	NM_009366	
Tshz2	NM_080455	
Tspyl4	NM_030203	
Tst	NM_009437	
Tstd3	NM_029840	
Ttbk1	NM_001162864	
Ttc39c	NM_028341	
Tubb2b	NM_023716	
Ugt2b1	NM_152811	
Ugt3a1	NM_207216	
Utp14b	NM_001001981	
Vmn1r214	NM_134214	
Vmn2r20	NM_001104634	
Vwa8	NM_173758	
Wdr25	NM_177602	
Ybx2	ENSMUST00000018698	
Zbtb32	NM_021397	
Zbtb7c	NM_145356	
Zfp367	ENSMUST000000117241	
Zfp467	NM_001085417	
Zfp536	NM_172385	
Zfp655	NM_001083958	
Zfp932	NM_145563	
Zmiz1	AK169397	

Tab. 9.6 Hochregulierte Gene der *Slc10a5*-Wildtyp-Maus – Cholsäurefütterung/Kontrolle

Zur Untersuchung des Einflusses der 0,5 % Cholsäurefütterung auf die Genexpression der *Slc10a5*-Knockout-Mäuse wurde aus den normalisierten Arraydaten mittels eines Excelmakros auf die Gene gefiltert, die konsistent eine Hochregulierung von mindestens Faktor 2 aufweisen. Als Schwellenwert der Intensität wurde 50 und als Surrogatwert 15 definiert, und kaum charakterisierte Gene wurden ausgeschlossen. Alle möglichen Quotienten aus mit Cholsäure gefütterten und kontrollgefütterten Wildtyp-Mäusen wurden gebildet und mit einbezogen.

Regulation  > 32-fach  8-32-fach  2-8-fach  0-2-fach

Gen Name	Gen Nummer		Gen Name	Gen Nummer	
Abcb1a	NM_011076		Cyp39a1	NM_018887	
Abcc12	ENSMUST00000156066		Cyp4a14	NM_007822	
Acnat2	NM_145368		Cyp4f16	NM_024442	
Adamtsl2	NM_029981		Ddit4l	NM_030143	
Aen	NM_026531		Ddn	NM_001013741	
Aldh3b1	NM_026316		Defb1	NM_007843	
Amn	NM_033603		Depdc1a	NM_001172092	
Anln	NM_028390		Dfna5	NM_018769	
Anxa2	NM_007585		Diap3	NM_019670	
Apoa4	NM_007468		DI4	NM_019454	
Apoc2	NM_009695		Dsn1	NM_025853	
Arhgap11a	NM_181416		E2f2	NM_177733	
Arhgap17	NM_144529		Ect2	NM_007900	
Arhgap18	NM_176837		Elovl7	NM_029001	
Arhgap19	NM_027667		Esco2	NM_028039	
Arhgef39	NM_001013377		Fam110a	NM_028666	
Arhgef7	NM_001113518		Fam110c	NM_027828	
Arl9	NM_206935		Fam35a	NM_029389	
Asf1b	NM_024184		Fam83e	NM_001033170	
Atp2b2	NM_009723		Fanca	NM_016925	
Atp8b5	NM_177195		Fanci	NM_145946	
Aurka	NM_011497		Foxm1	NM_008021	
B4gal5	NM_019835		Gcm1	NM_008103	
Birc5	NM_009689		Gcnt2	NM_133219	
Bub1	NM_009772		Gins2	NM_178856	
Capsl	NM_029341		Gipc2	NM_016867	
Cbr1	NM_007620		Git2	NM_019834	
Cbr3	NM_173047		Golm1	NM_027307	
Ccdc107	ENSMUST00000107922		Gpr64	NM_178712	
Ccdc120	NM_207202		Gsta4	NM_010357	
Ccl3	NM_011337		Gstm1	NM_010358	
Ccna2	NM_009828		Gstm2	NM_008183	
Ccnb1	NM_172301		Gstm3	NM_010359	
Ccnb2	NM_007630		Gusb	ENSMUST00000122994	
Ccnd1	NM_007631		H1fx	NM_198622	
Ccsap	NM_028536		H2bfbm	NM_027067	
Cd209a	NM_133238		Hist1h3g	NM_145073	
Cdc20	NM_023223		Hkdc1	NM_145419	
Cdc25a	NM_007658		Hyls1	NM_029762	
Cdca2	NM_175384		Ifi2712b	NM_145449	
Cdca3	NM_013538		Ifnlr1	NM_174851	
Cdca5	NM_026410		Igsf9	NM_033608	
Cdca8	NM_026560		Il22ra1	NM_178257	
Cdk1	NM_007659		Il3ra	NM_008369	
Cdkn1a	NM_007669		Il9r	NM_001134458	
Cdkn3	NM_028222		Incenp	NM_016692	
Cenpe	NM_173762		Ins16	NM_013754	
Cenpi	NM_145924		Iqgap3	NM_001033484	
Cenpp	NM_025495		Isyna1	NM_023627	
Chaf1a	NM_013733		Kif20a	NM_009004	
Chrdl2	NM_133709		Kif20b	NM_183046	
Chtf18	NM_145409		Kif22	NM_145588	
Ckap2	NM_001004140		Kif23	NM_024245	
Ckap2l	NM_181589		Kif2c	NM_134471	
Clcn5	NM_001243762		Kif4	NM_008446	
Clhc1	NM_001081099		Kifc1	NM_001195298	
Crebbp	NM_001025432		Kif6	NM_011803	
Crip2	NM_024223		Knstrn	NM_026412	
Crym	NM_016669		Kntc1	NM_001042421	
Cyp2c55	NM_028089		Krt31	NM_010659	





Anhang

Gen Name	Gen Number	
Lcn2	NM_008491	
Lhx6	NM_008500	
Loxl4	NM_001164311	
Ly6e	NM_001164036	
Mad2l1	NM_019499	
Map4k4	NM_001252200	
Marco	NM_010766	
Mcm6	NM_008567	
Megf9	NM_172694	
Melk	NM_010790	
Mfsd7a	NM_172883	
Mgst3	NM_025569	
Mki67	NM_001081117	
Mlf1ip	NM_027973	
Mmp14	NM_008608	
Mthfd1l	NM_172308	
Mtnr11	NM_181409	
Mxd3	NM_016662	
Mybl1	NM_008651	
Myh14	NM_001271540	
Myom3	NM_001085509	
Ncapg2	NM_133762	
Ncaph	NM_144818	
Nek2	NM_010892	
Nid1	NM_010917	
Nipa1	NM_153578	
Npvf	NM_021892	
Nrg1	NM_178591	
Nsl1	NM_198654	
Nusap1	NM_133851	
Oip5	NM_001042653	
Pafah1b3	NM_008776	
Pbk	NM_023209	
Pcsk5	NM_001190483	
Pde4d	NM_011056	
Phlda2	NM_009434	
Pif1	NM_172453	
Pla2g7	NM_013737	
Plekhh1	NM_181073	
Plk1	NM_011121	
Plk4	NM_011495	
Plxna3	NM_008883	
Poc1a	NM_027354	
Polk	NM_012048	
Ppl	NM_008909	
Prc1	NM_145150	
Prelid2	NM_029942	
Prg4	NM_021400	
Prom1	NM_001163577	
Psrc1	NM_001190161	
Ptgr1	NM_025968	
Racgap1	NM_001253809	
Rad51	NM_011234	
Rad51b	NM_009014	

Gen Name	Gen Number	
Rad54b	NM_001039556	
Rdh9	NM_153133	
Rrm2	NM_009104	
S100g	NM_009789	
Sacs	ENSMUST00000119943	
Sapcd2	NM_001081085	
Setd3	ENSMUST00000147466	
Sgol1	NM_028232	
Sgol2	NM_199007	
Shcbp1	NM_011369	
Ska1	NM_025581	
Slc10a2	NM_011388	
Slc13a5	NM_001004148	
Slc17a4	NM_177016	
Slc26a6	NM_134420	
Slc37a4	AK040077	
Slc51b	NM_178933	
Slpi	NM_011414	
Smpd3	NM_021491	
Snx6	NM_026998	
Soat2	NM_146064	
Spag5	NM_017407	
Spc25	NM_001199123	
Specc1	NM_001029936	
Spr1a	NM_009264	
Stmn1	NM_019641	
Sult1e1	NM_023135	
Syce2	NM_027954	
Tacc3	NM_001040435	
Tagln2	NM_178598	
Tars2	NM_027931	
Tc2n	NM_028924	
Tceal5	NM_177919	
Tinag	NM_012033	
Tlr2	NM_011905	
Tm4sf4	NM_145539	
Tmem141	NM_001040130	
Tmprss2	NM_015775	
Tnfrsf10b	NM_020275	
Tnfrsf12a	NM_013749	
Top2a	NM_011623	
Tpx2	NM_028109	
Trim59	NM_025863	
Trip13	NM_027182	
Trp63	NM_001127261	
Ttc39a	NM_153392	
Tubb6	NM_026473	
Uap1l1	NM_001033293	
Ube2c	NM_026785	
Uhrf1	NM_010931	
Wfdc16	NM_001012723	
Wfdc2	NM_026323	
Zdhc2	ENSMUST00000049389	
Zwilch	NM_026507	

Tab. 9.7 Herabregulierte Gene der *Slc10a5*-Wildtyp-Maus – Cholsäurefütterung/Kontrolle

Zur Untersuchung des Einflusses der 0,5 % Cholsäurefütterung auf die Genexpression der *Slc10a5*-Knockout-Mäuse wurde aus den normalisierten Arraydaten mittels eines Excelmakros auf die Gene gefiltert, die konsistent eine Herabregulierung von mindestens Faktor 2 aufweisen. Als Schwellenwert der Intensität wurde 50 und als Surrogatwert 15 definiert, und kaum charakterisierte Gene wurden ausgeschlossen. Alle möglichen Quotienten aus mit Cholsäure gefütterten und kontrollgefütterten Wildtyp-Mäusen wurden gebildet und mit einbezogen.

Regulation  > 32-fach  8 - 32-fach  2 - 8-fach  0 - 2-fach

Gen Name	Gen Nummer		Gen Name	Gen Nummer	
Aadat	NM_011834		D0H4S114	NM_053078	
Acaa1b	NM_146230		Dct	NM_010024	
Acat1	NM_144784		Ddc	NM_016672	
Acsm1	NM_054094		Dio1	NM_007860	
Adam2	NM_009618		Diras1	NM_145217	
Alas2	NM_009653		Dnahc11	NM_010060	
Ankrd23	NM_153502		Dnajb11	NM_026400	
Anks1b	AK036288		Dnttp1	AK168315	
Aox3	NM_023617		Duox1	NM_001099297	
Arhgef33	NM_001145452		Egfr	NM_207655	
Atl2	NM_019717		Elov13	NM_007703	
Atp12a	NM_138652		Fam89a	NM_001081120	
Bcl11a	ENSMUST00000109516		Fdft1	NM_010191	
Birc7	NM_001163247		Fermt2	NM_146054	
Btg2	NM_007570		Fgf13	ENSMUST00000131319	
C2cd4d	NM_001136117		Fitm1	NM_026808	
C8b	NM_133882		Fmn1	NM_010230	
Cad	NM_023525		Foxl2	NM_012020	
Car1	NM_009799		G6pc2	NM_021331	
Car3	NM_007606		Gabrg3	NM_008074	
Cd209f	NM_026956		Ghr	NM_010284	
Cd6	NM_009852		Gjb2	NM_008125	
Ces1e	NM_133660		Gnat1	NM_008140	
Ces1f	NM_144930		Gpr110	NM_133776	
Ces3a	NM_198672		Gpr25	NM_001101516	
Ces3b	NM_001159415		Gpr45	NM_053107	
Ces4a	NM_146213		Grip2	NM_001159507	
Chchd2	NM_024166		Gtpbp3	NM_032544	
Chrmg	NM_009604		Hdx	ENSMUST00000113422	
Cidea	NM_007702		Hes6	NM_019479	
Cir1	NM_025854		Hsd17b2	NM_008290	
Cldn7	ENSMUST00000060651		Hsd17b3	NM_008291	
Clec2e	NM_153506		Hsd3b2	NM_153193	
Clec2g	NM_027562		Hsd3b5	NM_008295	
Clic5	NM_172621		Htra4	NM_001081187	
Cma2	NM_001024714		Ick	NM_019987	
Cmah	NM_007717		Inmt	NM_009349	
Cml5	NM_023493		Jakmip1	NM_178394	
Cnksr2	ENSMUST00000112513		Junb	NM_008416	
Col27a1	NM_025685		Keg1	NM_029550	
Cryaa	NM_013501		Kiss1	NM_178260	
Csad	NM_144942		Klf1	NM_010635	
Ctrb1	NM_025583		Klf17	NM_029416	
Cyp2c37	NM_010001		Krt9	NM_201255	
Cyp2c44	NM_001001446		Krtap19-5	NM_010676	
Cyp2c50	NM_134144		Krtap5-5	NM_001037822	
Cyp2c54	NM_206537		L1cam	NM_008478	
Cyp2d34	NM_145474		Lad1	NM_133664	
Cyp2d9	NM_010006		Lama3	NM_010680	
Cyp2e1	NM_021282		Lefty1	NM_010094	
Cyp2u1	AK041477		Lhx3	NM_001039653	
Cyp46a1	NM_010010		Lhx9	NM_001042577	
Cyp4a12a	NM_177406		Lifr	NM_013584	
Cyp4a12b	NM_172306		Lipe	NM_010719	
Cyp4a30b-p	NM_001100185		Lipn	NM_027340	
Cyp4f14	NM_022434		Mab2112	NM_011839	
Cyp4f40	NM_001101588		Mcm10	NM_027290	
Cyp7a1	NM_007824		Med1	NM_134027	
Cyp7b1	NM_007825		Moxd1	NM_021509	
Cyp8b1	NM_010012		Mrgpre	NM_175534	

Anhang

Gen Name	Gen Number	
Mup2	NM_001045550	
Mup21	NM_001009550	
Mup4	NM_008648	
Mup5	NM_008649	
Mup9	NM_001126319	
Mvd	NM_138656	
Myct1	NM_026793	
Myh2	NM_001039545	
Myh6	NM_001164171	
Nanog	NM_028016	
Nat8	NM_023455	
Neb	NM_010889	
Negr1	NM_001039094	
Nr4a1	NM_010444	
Nudt7	NM_024437	
Nwd1	ENSMUST00000160443	
Olfr1198	NM_207567	
Olfr125	NM_146290	
Olfr1307	NM_001011787	
Olfr1384	NM_146472	
Olfr1511	NM_146271	
Olfr1535	NM_207572	
Olfr392	NM_147006	
Olfr631	NM_001271020	
Olfr870	NM_146904	
Olfr910	NM_146811	
Olfr965	NM_001011859	
Oprm1	ENSMUST00000143875	
Oxtr	NM_001081147	
Paqr9	NM_198414	
Pax2	NM_011037	
Pcdhb1	NM_053126	
Pcdhb12	NM_053137	
Pcp4	NM_008791	
Pdilt	NM_027943	
Penk	NM_001002927	
Pglyrp2	NM_001271478	
Plod1	NM_011122	
Pm20d2	NM_001034867	
Pon1	NM_011134	
Ppara	NM_011144	
Ppp1r3g	NM_029628	
Prok1	BC042707	
Prss44	ENSMUST00000141089	
Ptk2b	NM_172498	
Rarres1	NM_001164763	
Rfx4	NM_001024918	
Rgcc	NM_025427	
Rhox2e	NM_001085348	
Ripply2	NM_001037907	
Rnf167	NM_027445	
Rxfp3	NM_178717	
Sc4mol	NM_025436	
Scap	NM_001001144	
Scn4b	NM_001013390	
Scnn1a	NM_011324	

Gen Name	Gen Number	
Selp	NM_011347	
Serpina12	NM_026535	
Serpina3c	NM_008458	
Serpina9	NM_027997	
Serpinb3d	NM_201376	
Shank1	NM_001034115	
Siglech	ENSMUST00000171077	
Slc13a2	NM_022411	
Slc13a4	NM_172892	
Slc19a1	NM_031196	
Slc1a2	NM_011393	
Slc22a16	NM_027572	
Slc22a28	NM_001013820	
Slc22a7	NM_144856	
Slc25a33	NM_027460	
Slc2a5	NM_019741	
Slc30a7	NM_023214	
Slc4a2	NM_009207	
Slc5a10	NM_001033227	
Slco1a1	NM_013797	
Sntg2	NM_172951	
Sohlh2	NM_028937	
Spsb1	NM_029035	
Sqle	NM_009270	
Srgap3	NM_080448	
Srrm2	NM_175229	
Sspo	NM_173428	
Sst	NM_009215	
St6galnac1	NM_011371	
Sucnr1	NM_032400	
Sult5a1	NM_020564	
Susd3	ENSMUST00000119721	
Syt6	NM_018800	
Tbc1d12	NM_145952	
Tex26	NM_029464	
Tgm3	NM_009374	
Th	NM_009377	
Tmc7	NM_172476	
Tmem14a	AK017734	
Tmem158	NM_001002267	
Tmem91	NM_177102	
Tnfrsf13b	NM_021349	
Trex2	NM_011907	
Trib1	ENSMUST00000118228	
Trim34a	NM_030684	
Ttc39c	NM_028341	
Ugt2b1	NM_152811	
Upp2	NM_029692	
Vmn1r214	NM_134214	
Ybx2	ENSMUST00000018698	
Zfand4	NM_001081317	
Zfp367	ENSMUST00000117241	
Zfp536	NM_172385	
Zfp655	NM_001083958	
Zmiz1	AK169397	

10 Danksagung

Meinem Doktorvater, Prof. Dr. Joachim Geyer, möchte ich danken für die herzliche Aufnahme in unser Institut, für viele heftige und doch fruchtbare wissenschaftliche Diskussionen und für das mir entgegengebrachte Vertrauen, Ideen unbesehen umsetzen zu dürfen. In Momenten von herben Rückschlägen fand er immer die richtigen Worte, um mir wieder genügend Motivation zu geben, trotzdem weiterzumachen. Danke für deine Unterstützung generell und die gute Betreuung, auch nachdem ich Gießen verlassen hatte.

Bei Herrn Prof. Dr. Ernst Petzinger möchte ich mich bedanken für seine ansteckende Freude an „der Leber“, die unkonventionellen Ansätze und historischen Anekdoten. Es macht mich traurig, dass Sie das Ergebnis nicht mehr sehen können.

Bedanken möchte ich mich natürlich auch bei externen Partnern, ohne deren Kooperation diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

- Herrn Dittrich-Breiholz aus der Zentralen Forschungseinrichtung „Transcriptomics“ der Medizinischen Hochschule Hannover, dass er uns unbürokratisch und schnell mit den Array-Analysen ausgeholfen hat, mich per Videokonferenz in die Auswertung eingeführt hat und für Fragen immer offen war.
- Herrn Dr. Diran Herebian im Stoffwechsellabor der Universitätsklinik Düsseldorf, der für mich die Massenspektrometrieuntersuchungen des Cholsäurefütterungsversuchs durchführte und dabei eine Vielzahl auch selten bestimmter Gallensäuren maß.
- Herrn Dr. Kernt Köhler und dem Institut für Veterinär-Pathologie für die kurzfristige Hilfe bei der Durchführung der histologischen Untersuchungen der Gewebe der Mäuse des Cholsäurefütterungsversuchs.
- Herrn Doktor Markus Donner aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Universitätsklinik Düsseldorf, der uns das durch Gallengangsligatur oder LPS-Behandlung vorbehandelte Rattenlebergewebe zur Verfügung stellte.
- dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie, wo Herr Prof. Dr. Martin Bergmann mir ermöglichte, Teile der Histologie und die *In-situ*-Hybridisierungen durchzuführen. Besonders Frau Jutta Dern-Wieloch, die mir mit der praktischen Durchführung zur Seite stand, und Frau Dr. Katja Hartmann, die mich mit Tipps zur Optimierung versorgte, sind hier zu erwähnen.
- dem Team des Instituts für Veterinär-Physiologie und -Biochemie, die mich mit qualitativ hochwertigen perfusionsfixierten Rattengeweben versorgt haben, von denen ich

Danksagung

die Immunfluoreszenzschnitte an ihrem Gefriermikrotom anfertigen durfte – wertvolle Praxistipps inklusive.

Ich möchte mich bedanken bei meinen Kolleginnen Stephanie Schmidt und Simone Burger für die Einführung in die Transportmessungen und Fluoreszenzmikroskopie, bei Klaus Schuh, der nicht nur meine Zellen, sondern auch mich mit Gartentipps versorgte, bei Anita Neubauer und Regina Leidolf für das „Drumherum“ und bei Dr. Jörg Alber, meinem Molekularbiologiejoker. Nicht zu vergessen Jasmin Kranz, mit der ich viele giftige, verstrahlte Stunden mit Mäusegalle und -urin verbracht habe und ohne die ich die Gallenblasenkatheterisierung – zwingendes Teamwork – nicht hätte durchführen können.

Birgit Kauß, der Fee im Hintergrund, die mich in ihre „Putzkammer“ aufnahm, und Christoph Zimmermann, unserem Technikspezialist, möchte ich danken für eure manchmal unsichtbare und doch wichtige Arbeit. Genauso den Tierpflegern, die sich hinter der Barriere um das Wohlergehen „meiner“ Mäuse gekümmert haben.

Sowohl fachlich als auch privat hat Barbara Döring, die gute Seele des Instituts, viel zu dieser Arbeit beigetragen, mit quasi unerschöpflichem Laborwissen, kritischen Diskussionen über Gallensäuretransporter und geheimen Schrankvorräten. Sie wurde genau wie Charlotte Strahle, mit der ich schon im ersten Semester am Sektionstisch stand, und meinen Zimmergenossinnen Katharina Bakhaus, Sabrina Elms Häuser und Jana Bartholomey zu einer guten Freundin. Liebe Charlotte, danke für geteiltes Freud und Leid auf unserer gemeinsamen Stelle, im schönen Gießen und auf Kongressreisen. Liebe Katharina, danke für Hilfe in allen Lebenslagen, Farbberatung, Bürobeduftung und für deine Anstrengungen die Herde mit Treffen und Aktionen zusammenzuhalten. Liebe Sabrina, ich denke gerne an unsere gemeinsame Zeit in Linden zurück, du Weggefährtin und quasi Mitbewohnerin, Freud- und Frustkumpanin, Mäusesitterin und Freundin. Es sollte auch jeder eine Sabi haben. Vielen Dank auch für die Hilfe mit der Chemie, insbesondere den für mich gezeichneten Gallensäurestrukturformeln. Durch euch wurde meine zweite Halbzeit in Gießen eine ganz besondere, denn wir haben gezeigt, dass man mit dem richtigen Team Arbeit und Privates ruhig vermischen darf.

Besonderes Lob haben meine fleißigen Korrekturleser Katharina, Barbara und mein Vater verdient, die viel Freizeit für mich opfern mussten.

Bedanken, aber viel mehr noch entschuldigen, möchte ich mich bei meiner Familie und Florian Lindner, für die ich oft keine Zeit hatte, die trotzdem immer hinter mir standen und sogar versucht haben zu verstehen, was ich da eigentlich tue.

Ich freue mich, mit euch allen ein wichtiges Stück Leben gemeistert zu haben.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation

„Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion des *Orphan Carriers* SLC10A5 *in vitro* und im *Slc10a5*-Knockout-Mausmodell“

selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Julia Silke Aretz



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6375-7



9 78 3 835 19 6375 7